

## EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES  
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT  
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE  
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE  
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena

Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG · BASEL 10

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

## SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

- H. BORCHERT und E. BAIER: Anhydritgesteine mit Pseudomorphosengefüge . . . . . 237  
R. STRÄSSLE: Fortschritte in der Isolierung und Untersuchung der Blutproteine . . . . . 242

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

- J. O. FLECKENSTEIN: Les cas d'exception au théorème de LAPLACE sur les perturbations séculaires des éléments vectoriels des orbites planétaires . . . . . 252  
S. PATAKI, K. MEYER und T. REICHSTEIN: Die Konfiguration des Digoxigenins . . . . . 253  
Mrs. A. CHATTERJEE und S. BOSE: The Constitution of Ajmaline (Disputandum) . . . . . 254  
J. N. CHATTERJEE: Synthesis of 3:8:9-Trimethoxy- and 3:4:8:9-Tetramethoxy- $\beta$ -Brazanquinone . . . . . 256  
A. K. BOSE: The Stereochemistry of the Reaction of Nitrous Acid with Cyclohexylamines . . . . . 256  
S. C. AGARWALA, V. K. MOHAN RAO, and D. L. SHRIVASTAVA: The Enzymatic Hydrolysis of Glutathione by *Vibrio Cholerae* . . . . . 257  
E. F. ROGERS, D. BOVET, V. G. LONGO, and G. B. MARINI-BETTOLO: Alkoxytrimethylammonium Salts and Muscarine . . . . . 260  
G. ASTALDI, E. BERNARDELLI, and G. REBAUDO: Research on the Proliferation Activity of Erythroblasts from Pernicious Anaemia in Relapse under Low Atmospheric Pressure . . . . . 261  
F. GAVOSTO et F. MOYSON: Etude de l'action du shock sur la concentration en acides nucléiques des différentes fractions cytoplasmiques du foie . . . . . 263  
J. JACOB et Mme G. GRASSI-GIALDRONI: Influence des stimuli thermoalgésiques sur la réactivité à la douleur de la souris . . . . . 264  
B. TANOS, S. SZILASY, V. VARRÓ, A. EISNER, and F. OLÁH: A Humoral Agent with Immediate Eosinopenic Effect other than Cortisone . . . . . 266  
P. HAUDUROY et W. ROSSET: Sensibilité du spermophile (*Citellus fluvius concolor*) à *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*-B.C.G. . . . . 267  
W. BOLLAG: Der Einfluss von Myleran auf die Keimdrüsen von Ratten . . . . . 268  
J. COLE and P. GLEES: Tests Used in the Localization of Cerebral Function in Trained Monkeys . . . . . 268  
F. BODE: Die quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs (Pro Laboratorio) . . . . . 271

*Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews*

- Plant Biochemistry. By James Bonner (Academic Press Inc., New York, 1950) (Ref. H. J. Bielig) . . . . . 272  
Electron Microscopic Histology of the Heart. By B. Kisch and J. M. Bardet (Brooklyn Medical Press, New York, 1951) (Ref. W. Bejdl) . . . . . 273  
Experimentelle Histo-Pathologie. Von H. Meessen (Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1952) (Ref. W. Bejdl) . . . . . 273  
Anatomia comparata dei vertebrati. Da Nello Beccari (Sansoni, Edizioni scientifiche, Firenze, 1951) (Ref. K. S. Ludwig) . . . . . 273

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

- Studiorum progressus: F. PAUTSCH: The Colour Change of the Zoea of the Shrimp, *Crangon crangon* L. . . . . 274  
Congressus . . . . . 276



# EXPERIENTIA



L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications*;
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées*.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

## EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît e 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 32.- pour la Suisse; pour l'étranger fr. 38.-. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la parution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces:  $\frac{1}{1}$  page fr. 220.-,  $\frac{1}{2}$  page fr. 132.-,  $\frac{1}{4}$  page fr. 77.-. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15  
Tél. 498 00; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und der Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 32.-, im Ausland sFr. 38.-.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 35 Tage vor Erscheinungstermin, das heisst am 10. des Monats für den folgenden Monat.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 x 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise:  $\frac{1}{1}$  Seite Fr. 220.-,  $\frac{1}{2}$  Seite Fr. 132.-,  $\frac{1}{4}$  Seite Fr. 77.-; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15  
Tel. 498 00; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni*;
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports*;
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPERIENTIA esce a 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 32.- per la Svizzera; all'estero fr. 38.-. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 x 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci:  $\frac{1}{1}$  pag. fr. 220.-,  $\frac{1}{2}$  pag. fr. 132.-,  $\frac{1}{4}$  pag. fr. 77.-; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15  
Tel. 498 00; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15<sup>th</sup> of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 32.-; other countries fr. 38.-. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10<sup>th</sup> of the preceding month.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 x 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising:  $\frac{1}{1}$  page fr. 220.-,  $\frac{1}{2}$  page fr. 132.-,  $\frac{1}{4}$  page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15  
Phone 498 00; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten - Liste des annonceurs - List of Advertisers - Experientia IX/6

CIBA AG., Basel  
Ganz & Co., Zürich

Hans Huber, Bern  
Sandoz AG., Basel

Trüb, Täuber & Co., Zürich  
Verlag Chemie, Weinheim



**Neuerscheinung aus dem Verlag Birkhäuser**

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

*Reihe der experimentellen Biologie – Band 12*

**Paul Buchner**

vormalis o. ö. Professor an der Universität Leipzig

# ENDOSYMBIOSE DER TIERE MIT PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

*(1953,) 772 Seiten mit 336 Abbildungen, 3 Tafeln und 5 Tabellen*

*In Ganzleinen gebunden Fr. 66.50 (DM 66.50), broschiert Fr. 62.40 (DM 62.40)*

*Inhalt:* 1. Entdeckungsgeschichte und Verbreitung der Endosymbiosen – 2. Spezieller Teil: Symbiosen bei Tieren, die sich von zellulosereichen Substanzen, krautigen Pflanzenteilen, Samen und ähnlichem ernähren. Symbiosen bei Tieren, welche in Baumfluss leben. Symbiosen bei Tieren, welche Pflanzensäfte saugen. Symbiosen bei Wirbeltierblut saugenden und Hornsubstanz verzehrenden Tieren. Symbiosen bei Tieren, welche von gemischter Kost leben: Symbiosen bei leuchtenden Tieren. In Exkretionsorganen lokalisierte Symbiosen – 3. Allgemeiner Teil: Die Wohnstätten der Symbionten. Die Wege der Übertragung. Die embryonalen und postembryonalen Geschehnisse. Die Wechselbeziehungen zwischen dem Wirtsorganismus und seinen Symbionten. System und Symbiose. Der Sinn der Endosymbiosen.

Nachdem seit der letzten umfassenden Bearbeitung des Zoologen und Physiologen, Bakteriologen und Mykologen in gleicher Weise interessierenden Gebietes 20 Jahre verflossen sind, wird es in diesem reichillustrierten Buch erneut von seinem besten Kenner erschöpfend behandelt.

*Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung*

**VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL / STUTTGART**



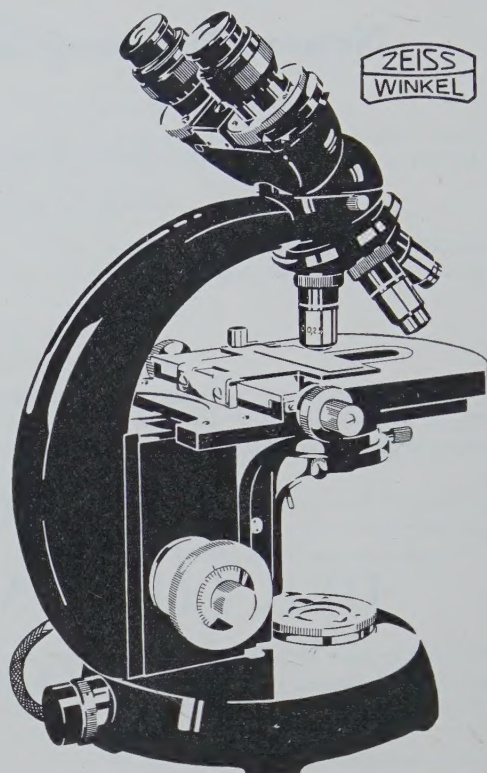
# NEUES **ZEISS-WINKEL** STANDARD-MIKROSKOP GF 525

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie
- Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung
- Grosser Kreuztisch mit koaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen
- Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive
- Vergrößerungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)
- Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor
- Neue Achromate und Neofluare mit dezimal-geometrischer Abstufung der Vergrößerungen

Auskunft und Vorführung durch die  
Generalvertretung für die Schweiz:

**GANZ & Co**  
BAHNHOFSTR. 40  
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*



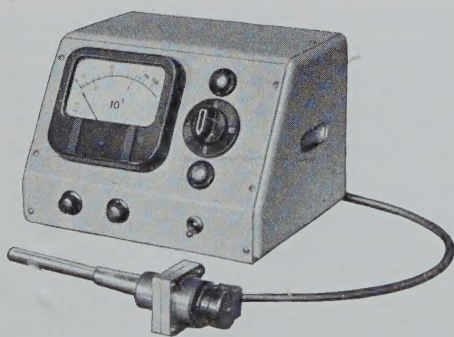
Gerätebau-Anstalt



Balzers (FL.)

## Vakuum-Messgeräte

kontinuierlich anzeigend zwischen  
10<sup>-5</sup> bis 1 mm Hg



Vollkommen unempfindlich gegen Lufteinbrüche in eingeschaltetem Zustand. Einstellzeit max. 2 Sek. Eingebauter Umschalter für Anschluss von 4 Messzellen, Gerät auch als „Leak-detektor“ verwendbar.

Verkaufsorganisation

**Trüb, Täuber & Co. AG. Zürich**

Fabrik elektr. Meßinstrumente und wissenschaftl. Apparate

Soeben erschien die 15. neubearbeitete und erweiterte Auflage

OTTO DIELS

## Einführung in die organische Chemie

1953. Gr. 8°, 344 Seiten mit 33 Abbildungen im Text. Ganzleinen DM 16.-

Während die 11., 12., 13. und 14. Auflage nur wenige Änderungen und Verbesserungen erfahren konnten, wurde die **15. Auflage in allen Teilen gründlich durchgearbeitet**. Bei der Aufnahme der neu aufgefundenen Tatsachen musste natürlich ein strenger Maßstab angelegt werden. Trotzdem wurden die grundlegenden Forschungen, die dem organischen Chemiker, dem Mediziner und Biologen unentbehrlich sind, vollständig berücksichtigt.

Aus einer Besprechung:

«... Diels bleibt das begehrte Lehrbuch zur Einführung in die organische Chemie für den Chemiker wie für den Naturwissenschaftler jeglicher Richtung und hat auch seinen Wert als einfaches Nachschlagewerk durch die zahlreichen Ergänzungen vermehrt.»

*Chemische Rundschau*



**VERLAG CHEMIE, GMBH.**  
WEINHEIM/BERGSTRASSE



## Anhydritgesteine mit Pseudomorphosengefüge<sup>1</sup>

*Ein Beitrag zum Werdegang ozeaner Salzlagerstätten*

Von H. BORCHERT, Clausthal<sup>2</sup>, und E. BAIER, Mainz<sup>3</sup>

Kommen bei stofflichen Umsetzungen im Mineralreich Kristalle zum Verschwinden, aber doch so, dass die ihnen eigentümliche Gestalt auf irgendeine Weise erkennbar aufgezeichnet bleibt, so spricht man von Pseudomorphosen. In jedem Mineralogielehrbuch findet man eine Menge Beispiele; das Charakteristische ist in jedem Fall, dass die Gestalt, weil ja reliktsch, nicht mehr dem Stoffbestand bzw. dem inneren Bauplan (Kristallgitter) entspricht. Die Umstände, die dabei das Hinüberretten der alten Gestalt ermöglichen, können jeweils recht verschieden sein. Oft ist der Ablauf sogar durchaus trivial und kann dann als solcher kaum tieferes Interesse beanspruchen, zum Beispiel wenn Kristalle einer leichtlöslichen Art aus einem resistenteren Gesamtverband ausgelöst werden und die Hohlformen in einem späteren Akt sich mit irgend etwas anderem füllen.

Indessen hat diese Pseudomorphosenbildung nicht ohne Grund gelegentlich auch weit ausserhalb des Fachgebietes Beachtung gefunden. So zieht sie beispielsweise OSWALD SPENGLER (Untergang des Abendlandes, II) heran, um – seiner Ansicht nach entsprechende – Beziehungen zwischen Kulturen zu verdeutlichen. Wir wollen hier natürlich nicht entscheiden, ob und inwieweit in diesen und anderen Beispielen der Vergleich zulässig ist. Was aber zu ihm geführt hat und was an dieser Pseudomorphosenbildung überhaupt allgemein auffällt, ist dies, dass im Endeffekt die reine Gestalt in aller Realität ein Eigendasein führt. Und eben daraus leitet sich ihre Bedeutung für die Geschichts-, im besonderen also für die Erdgeschichtsforschung her. Es sei uns erlaubt, dies im folgenden an einem der grossartigsten Beispiele von Pseudomorphosenbildung zu erläutern. Doch müssen dabei einige allgemeine Betrachtungen vorangestellt werden.

Bei kristallisierter Materie von vorgegebenem Chemismus müssen wir allgemein damit rechnen, dass sie in Anpassung an geänderte Druck- und Temperaturver-

hältnisse ganz oder teilweise in neue Gitterzustände übergeht (von dem Übergang in den ungeordneten Zustand, Schmelzen, sei hier abgesehen). Die Lehre von der Gesteinsmetamorphose, eine wichtige petrologische Arbeitsrichtung, beschäftigt sich überwiegend mit solchen Änderungen der Gitterzustände innerhalb bestimmter Erdkrustenbereiche.

Es ist nun zu beachten, dass die jeweils realisierten homogenen Gitterordnungen als solche weitgehend unabhängig sind von der Vorgeschichte. Diese lässt sich also grundsätzlich nur ablesen aus der Aussengestalt der einzelnen Kristallkörner, aus ihrer absoluten und relativen Grösse sowie ihrer gegenseitigen räumlichen Anordnung und Ausrichtung, also aus dem Korngefüge. Natürlich werden alle diese morphologischen Gegebenheiten bei durchgreifenden Stoffumsetzungen und atomaren Umordnungen im Gestein gewöhnlich entsprechend in Mitleidenschaft gezogen werden; so erklärt sich die verhängnisvolle, vorgeschichtsverwischende Wirkung der Gesteinsmetamorphose. Immerhin können unter günstigen Voraussetzungen Form- und Gefügerelikte, wie wir sie in den Pseudomorphosen schon kennenlernten, doch wichtige Anhaltspunkte für Aussagen über den Zustand vor der Metamorphose übermitteln.

Wenden wir uns nunmehr dem Sedimentmantel der Erde zu, so zeigt sich, dass durchgreifende Metamorphose im wesentlichen beschränkt ist auf solche Bereiche, die zeitweilig in beträchtliche Tiefe gerückt waren, und andererseits solche, die im Rahmen gebirgsbildender (tektogenetischer) Vorgänge kräftig mechanisch durchbewegt wurden. Doch gibt es einige Sedimente von ungewöhnlichem Chemismus, die so empfindlich auf Bedingungsänderungen ansprechen, dass sie, auch als Einschaltung in sonst ganz ungestörten Sedimentserien, meist schon den Charakter metamorpher Gesteine angenommen haben. Mindestens hat man bei ihnen nie die Gewähr, in ihnen noch einigermaßen den ursprünglichen Zustand der Ablagerung vor sich zu haben. Hierher gehören in erster Linie die ozeanischen Salzlager, einschliesslich der gewaltigen Mengen Kalziumsulfats, die in ihrem Verband, insbesondere aber als Vorphase ihrer Entstehung, abgesetzt wurden.

<sup>1</sup> Eine ausführliche Darstellung erscheint im Rahmen einer Arbeit *Zur Metamorphose ozeaner Gipsablagerungen* im N. Jb. Mineral. Abh. 1953.

<sup>2</sup> Institut für Mineralogie, Petrographie und Lagerstättenkunde, Bergakademie Clausthal.

<sup>3</sup> Institut für Mineralogie und Petrographie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.



Infolge der ungewöhnlichen Anfälligkeit dieser Gesteine fehlen die Schwierigkeiten für die Rekonstruktion des genetischen Ablaufs (bis zurück zum Sedimentationsakt) bei ihnen fast nie; dies ist hier besonders schmerzlich, denn eine genaue Kenntnis des ursprünglichen Zustandes dieser ungewöhnlichen Ablagerungen käme vielen Nachbarwissenschaften, so der Meeres- und Klimakunde, Paläogeographie u.a., zugute, ganz abgesehen von bisweilen bedeutenden lagerstättenkundlichen und bergbaulichen Konsequenzen.

Schon die Kalziumsulfatgesteine für sich allein bieten genug derartige Probleme, die aber zudem in engem Zusammenhang stehen mit der Beurteilung der gesamten Lagerstättenverbände. In einigen Formationen wurde das Kalziumsulfat nachweislich als Gips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , monoklin) abgesetzt und ist auch als solcher erhalten geblieben. In den ausgedehnten deutschen Zechsteinlagern liegt es heute dagegen als Anhydrit (wasserfreies  $\text{CaSO}_4$ , orthorhombisch) vor; ob es auch dort zunächst als Gips abgesetzt und erst nachträglich bei fortschreitendem Absinken und Überdecktwerden der Sedimente entwässert wurde, darüber stand eine Entscheidung bis jetzt noch aus. Sie schien aus einem besonderen Grunde – wie wir noch zeigen werden – höchst wünschenswert.

Nicht nur die Gleichgewichtsbedingungen im binären System  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ , sondern auch die Ausscheidung von Kalziumsulfat aus Meerwasserlösung in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentrationsverhältnissen wurden schon mehrfach<sup>1</sup> im Laboratorium eingehend untersucht. Leider aber lassen solche Experimente kaum bindende Schlüsse für das Naturgeschehen zu. So herrscht schon hinsichtlich der Temperaturen, mit denen man in den einzelnen Phasen dieser räumlich wie zeitlich stark gegliederten Ausscheidungsfolge zu rechnen hat, keine Einigkeit. Vor allem aber ist es, bei offensichtlich sehr tragem Ablauf der Reaktionen, unmöglich, die Experimente im zeitlichen Verlauf den Naturvorgängen einigermaßen anzupassen. Immerhin scheinen die Ergebnisse mit der Annahme durchaus verträglich, dass aus eingegengten Meeresräumen, auch noch bei sehr extremen Bedingungen (Sättigung an NaCl, relativ hohe Temperatur), nur Gips ausfällt und sich zunächst auch hält.

Um so dringender wird das Bedürfnis nach einem *direkten Nachweis* der ursprünglichen Abscheidung des Kalziumsulfats als Gips, auch dort, wo – wie innerhalb der Zechsteinfolge – heute Anhydrit vorliegt. Wir dürfen nach dem oben Ausgeführten diesen Nachweis nur aus Form- bzw. Gefügerelikten erhoffen. Auf den ersten Blick erscheinen die Aussichten gering, denn die sali-

naren Anhydritgesteine zeigen im allgemeinen ein recht monotones, feinkörniges Gefüge. Zum Glück gibt es aber einige auffällige Ausnahmen, wenn auch weniger bei den reinen Anhydrit-, so doch bei den Anhydrit-Steinsalz-Gesteinen. So kennt man seit langem einen weit durchgreifenden, in vielen Gruben erschlossenen Horizont, den sogenannten *Pegmatitanhydrit*. Sein höchst eigenartig grobkörniges Gefüge hat dem Gestein sogar den Namen gegeben. Freilich trifft der Vergleich mit Pegmatiten, diesen Kristallisaten magmatischer Restschmelzen, nichts Wesentliches. Auch wenn der Name von vornherein nur aufs Gefüge gemünzt war, ist er doch wenig glücklich, ja geradezu irreführend. Schon ZIMMERMANN, der das Gestein als erster beschrieben hat<sup>1</sup>, erkannte es als das, was es ist, nämlich als grossartige Pseudomorphose. Leider lagen in seinem Falle, wie seine Beschreibungen und Fotos zeigen, bei unübersichtlicher Aggregation spiessiger Scheinkristalle die Verhältnisse für eine Ermittlung des Urminerals recht ungünstig. Und so versagte sich ZIMMERMANN eine Entscheidung.



Abb. 1. Pegmatitanhydrit, Vienenburg. Scheinkristalle aus vorherrschend Steinsalz (dunkel), in dichtem Anhydrit (hell).

Von anderen Vorkommen kennt man nun aber viel klarere Bilder, und überhaupt sind derartige Gefüge keineswegs auf diesen einen Horizont beschränkt. Die Verfasser haben es daher unternommen, eine umfangreiche Aufsammlung von Anhydritgesteinen der verschiedensten Vorkommen und Horizonte zu sichten, zur vergleichenden Untersuchung der Gefügerelikte.

Ziehen wir zunächst nur diejenigen Belegstücke heran, die ganz einwandfrei als Kristallformen ansprechbare Relikte aufweisen, so kann man in der stofflichen Ausbildung folgende Typen unterscheiden:

1. Räumlich isolierte Scheinkristalle aus klarem, grob-

<sup>1</sup> J. H. VAN'T HOFF und Mitarbeiter: *Untersuchungen über die Bildungsverhältnisse der ozeanischen Salzablagerungen, insbesondere des Stassfurter Salzlagere*, hg. v. H. PRECHT und E. COHEN (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1912). – E. POSNJAK, Amer. J. Sci. 5. Ser. 35, A, 247 (1938); 238, 559 (1940). – T. TORIUMI und R. HARA, Technol. Rep. 12, 72 (1938), Tohoku Imper. Univ. Sendai, Japan, 1938.

<sup>1</sup> E. ZIMMERMANN, Z. dtsh. geol. Ges. 59, Mbr. 136 (1907); 61, 10 (1909), Z. Kali 3, 14 (1909).



körnigem Steinsalz in weissem, dichtem Anhydrit eingebettet (Abb. 1). Bei zunehmendem Einbau vorwiegend lamellarer, zonarer oder fiederförmiger anhydritischer Partien im Innern der Scheinkristalle ergeben sich Übergänge zu 2. Die Scheinkristalle sind nur mehr als

nur im Querschnitt erfassen, bei zonarer Schichtung kann man zwecks Mittelwertbildung die Spuren sämtlicher Flächen vermessen; auch lassen sich alle Abweichungen vom ebenen Verlauf (Verkrümmungen, Verwerfungen, Stufen, Riefen) im Detail verfolgen.

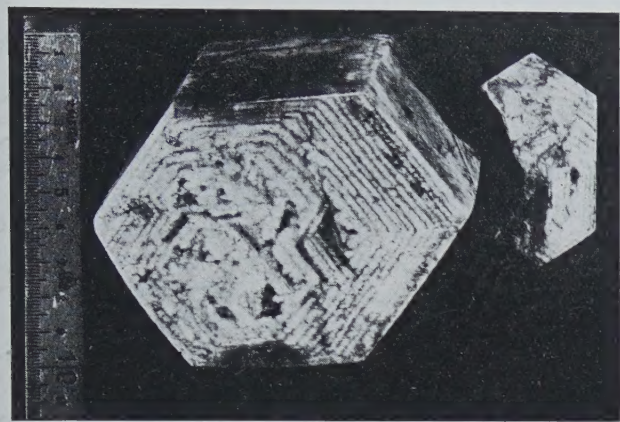


Abb. 2. Basalanhydrit von Volkenroda. Querschnitt durch herauspräparierte, zonar gebaute Scheinkristalle. Hell: Anhydrit, dunkel: Steinsalz.

zarte Zonenfolgen aus Steinsalz aufgezeichnet (Abb. 2). 3. In reinem, steinsalzfreiem Anhydritgestein sind die Umrisse der ehemaligen Kristalle lediglich durch eine etwas abweichende Transparenz angedeutet (Abb. 3).

Zur goniometrischen Vermessung: Bei der Ausbildung 1 liegt ein Herauslaugen und nachheriges Ausgießen der Hohlformen nahe (Abb. 4). Bei 2 und 3 empfiehlt es sich dagegen, die Scheinkristalle durch einige willkürlich, aber günstig, das heisst möglichst quer zu den Grenzflächen geführte Schnittflächen zu zerteilen. Man kann dann die gegenseitige Lage der Kristallflächen aus dem Verlauf ihrer Spuren auf diesen künstlichen Schnittebenen errechnen oder in der stereographischen Projektion graphisch ermitteln. Dieses Vorgehen wird bei der Untersuchung eingewachsener Formen dem Versuch direkten Isolierens häufig vorzuziehen sein, denn zarte Vorzeichnungen lassen sich oft

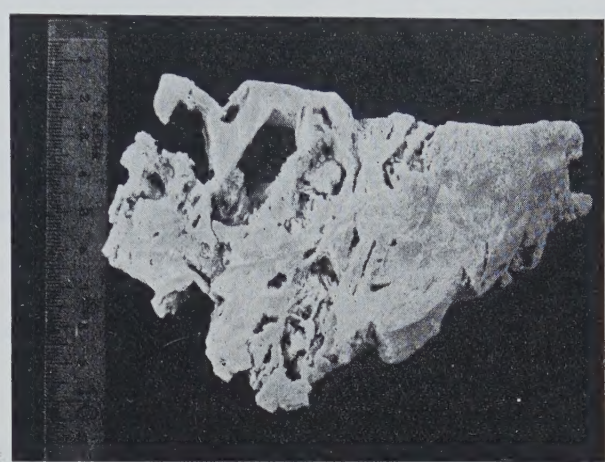


Abb. 4. Pegmatitanhydrit, Vienenburg. Steinsalz ausgelöst.

Das Gesamtergebnis der Untersuchung war folgendes: Obwohl die Scheinkristalle unterschiedlicher Fundpunkte im Habitus oft stark voneinander abweichen, so besteht doch kein Zweifel, dass allen ein und dasselbe *monokline* Urmineral zugrunde liegt. Und zwar entsprechen die Winkel – soweit man es bei dem Erhaltungszustand der Gestalten jeweils überhaupt verlangen kann – durchaus dem Gips. Am verbreitetsten sind dicktafelige, als Kombinationen von  $\{010\}$ ,  $\{110\}$ ,  $\{111\}$  mit zurücktretendem  $\{\bar{1}11\}$  zu deutende Gestalten. Paarige Verwachsungen, die ganz Zwillingen nach  $[001]$  entsprechen, sind reichlich anzutreffen und bei günstiger Ausbildung noch durch fiederig gestellte anhydritische Sparren im Kristallinnern als solche betont (Abb. 5).



Abb. 5. Pegmatitanhydrit, Vienenburg. Pseudomorphose nach einem Zwilling. Man beachte das anhydritische Sparrenwerk (weiss) im Steinsalz.

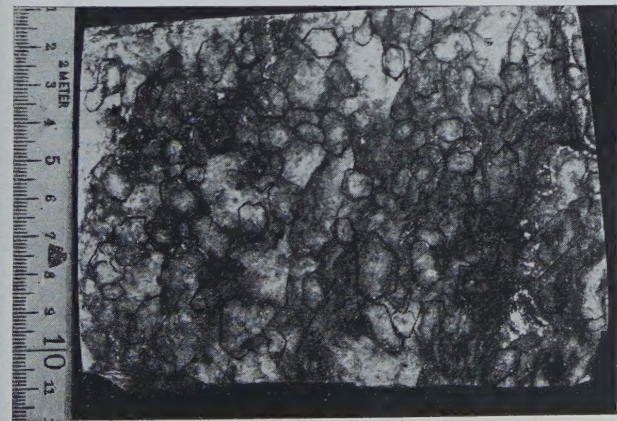


Abb. 3. Hauptanhydrit, Gewerkschaft Hildesia. NaCl-frei, wolkeig, mit feinen polygonalen Umrisse (durch Nachzeichnen verstärkt!).

Man darf nun gewiss nicht annehmen, dass die den Pseudomorphosen zugrunde liegenden, zum Teil riesigen Gipskristalle (Säulen von mehr als 10 cm  $\varnothing$ ) als solche unmittelbar aus dem Meer abgeschieden wurden. Es liegen hier ausgesprochene *Porphyroblasten* (genauer *Idioblasten*, da von kristallgemässer Eigen-



gestalt) vor, das heisst um einsprenglingsartig in feinkörniger Grundmasse schwebende Kristalle, wie sie durch Stoffsammlung um einzelne Zentren bei metamorphen Vorgängen vielfach entstehen.

NOLL<sup>1</sup> hat sich eingehend mit der Porphyroblastese in Gipssteinen befasst. Er stellt eine generelle Neigung zur Bildung solcher Einsprenglinge entlang von Schichtfugen und Klüftchen (Wasserführung!) fest, wobei sich die mehr oder weniger langprismatischen Idioblasten einigermassen senkrecht zu den Kluft- (bzw. Schicht-) Flächen ausrichten. Isoliert in der Grundmasse schwebende Kristalle bevorzugen dagegen einen mehr dicktafeligen Habitus. Unreine Anwachszone bzw. Sektoren kann man an Gipskristallen häufig beobachten; solche sind ja zur bleibenden Markierung gestaltlicher Elemente besonders geeignet.



Abb. 6. Pegmatitanhydrit, Bohrloch Lossa E. bei Wiehe. Zeichnung nach einer Photographie von ZIMMERMANN.

Überhaupt stimmen die Beobachtungen an unveränderten, Idioblasten führenden Gipssteinen ausgezeichnet mit den unsrigen, an Anhydriten festgestellten überein. So wird man die mehr spiessig aggregierten, deutlich an Strukturlinien aufgereihten Scheinkristalle – besonders schön auf den Zimmermannschen Fotos zu sehen (Abb. 6) – in Schichten einweisen müssen, in denen durch Wechsellagerung, Klüftung und dergleichen die Wasserführung stark inhomogen war, dagegen die Durchschwärmung mit tafeligen Idioblasten in mächtige, relativ unegliederte, gleichmässig durchfeuchtete Gipsmassen.

Alles in allem ergibt sich so, unter Heranziehung der Dünnschliffuntersuchung, ein ganz befriedigendes Bild vom Werdegang unserer Pseudomorphosen: 1. *Abscheidung* von feinkristallinem, lockerem Gips. 2. Nach *Verfestigung* zu eigentlichem Gipsstein bei fortschreitender Überdeckung *Idioblastese* in örtlich verschiedener Ausbildung und Intensität. 3. Bei stark angewachsener Belastung und erhöhter Temperatur *Entwässerung*, zunächst der anfälligeren, feinkörnigen *Grundmasse*. 4. Übergreifen der Umwandlung auch auf die durch

Verunreinigung, Translationen u. a. *weniger resistenten* Partien der *Idioblasten*. Im 5. und letzten Akt fallen auch die bis jetzt *überlebenden Kristallbereiche* dem Angriff der warmen, oft steinsalzgesättigten Lösungen zum Opfer, und gerade sie werden dann unter Umständen ganz durch NaCl ersetzt.

Entscheidend hinsichtlich der weiteren Konsequenzen ist die Frage nach der Generalisierbarkeit dieser aus Einzelbeobachtungen abgeleiteten genetischen Vorstellungen. Wenn wir diese Generalisierbarkeit hier in aller Strenge behaupten, so wird man von uns mit Recht den Nachweis verlangen, dass es sich bei den beschriebenen Bildungen nicht um Einzelfunde, vielleicht ganz anomaler Entstehung, handelt. Der Hinweis, dass an Proben von rund 60 räumlich getrennten Entnahmepunkten einwandfrei solche Gestaltrelikte festgestellt werden konnten, wird vielleicht nicht befriedigen, selbst dann nicht, wenn wir beifügen, dass die Handstücke gar nicht im Hinblick auf das vorliegende Problem aufgesammelt wurden und fast alle wichtigen Grubenreviere und Anhydrit Horizonte repräsentierten. Man wird uns entgegenhalten, dass die grosse Masse der Anhydritgesteine eben doch frei von irgendwelchen deutlichen Relikten sei.

Dies soll natürlich nicht bestritten werden. Berücksichtigt man aber die grosse Zahl unabhängiger Bedingungen, die zur Ausbildung von Pseudomorphosen in unserem Fall nötig sind, so wird man doch zugeben müssen, dass die Ausbeute reicher ist, als man überhaupt erwarten darf. Denn in weiten Bereichen der Gipslager, besonders in mächtigen, unegliederten Massen, wird es nur zu einer gleichmässigen Kornvergrößerung kommen – wie es für monomineralische Gesteine ja an sich die Regel ist. Bilden sich aber unter günstigen Bedingungen doch irgendwo Porphyroblasten, so fehlt ihnen meist eine charakteristische «Eigengestalt»: Knoten und Knötchen oder unregelmässig lappig-zackige Körner sind, sowohl nach NOLL wie nach unseren eigenen Beobachtungen, die Regel. Aber selbst da, wo sich grosse, charakteristisch begrenzte Kristalle ausgeschieden haben, wird ihre Gestalt nur bei ganz subtilem Ablauf der Umwandlung aufgezeichnet bleiben. Man denke daran, dass Gipskristalle auf Grund vorzüglicher Spaltbarkeiten und Translatierbarkeit besonders empfindlich gegen mechanische Beanspruchung sind, und solche sind bei einer Umwandlung mit bedeutendem Volumeneffekt unausbleiblich. Tatsache ist nun, dass im Handstück durchaus einförmig wirkende, dichte Anhydrite auf ebener Anschlifffläche bei aufmerksamer Betrachtung oft wolkige, brekziöse, wabenartige Zeichnungen erkennen lassen, Zeichnungen, die übrigens mitunter durch alle Übergänge mit ausgesprochen polygonalen Scheinkristallen verbunden sind.

Dies alles nur, um zu zeigen, wie ungerechtfertigt es wäre, zu verlangen, dass nun sämtliche Anhydritgesteine deutliche Pseudomorphosen nach Gips aufweisen. Was uns aber am meisten unsere Behauptung zu

<sup>1</sup> W. NOLL, Chem. Erde 9, 1 (1934).



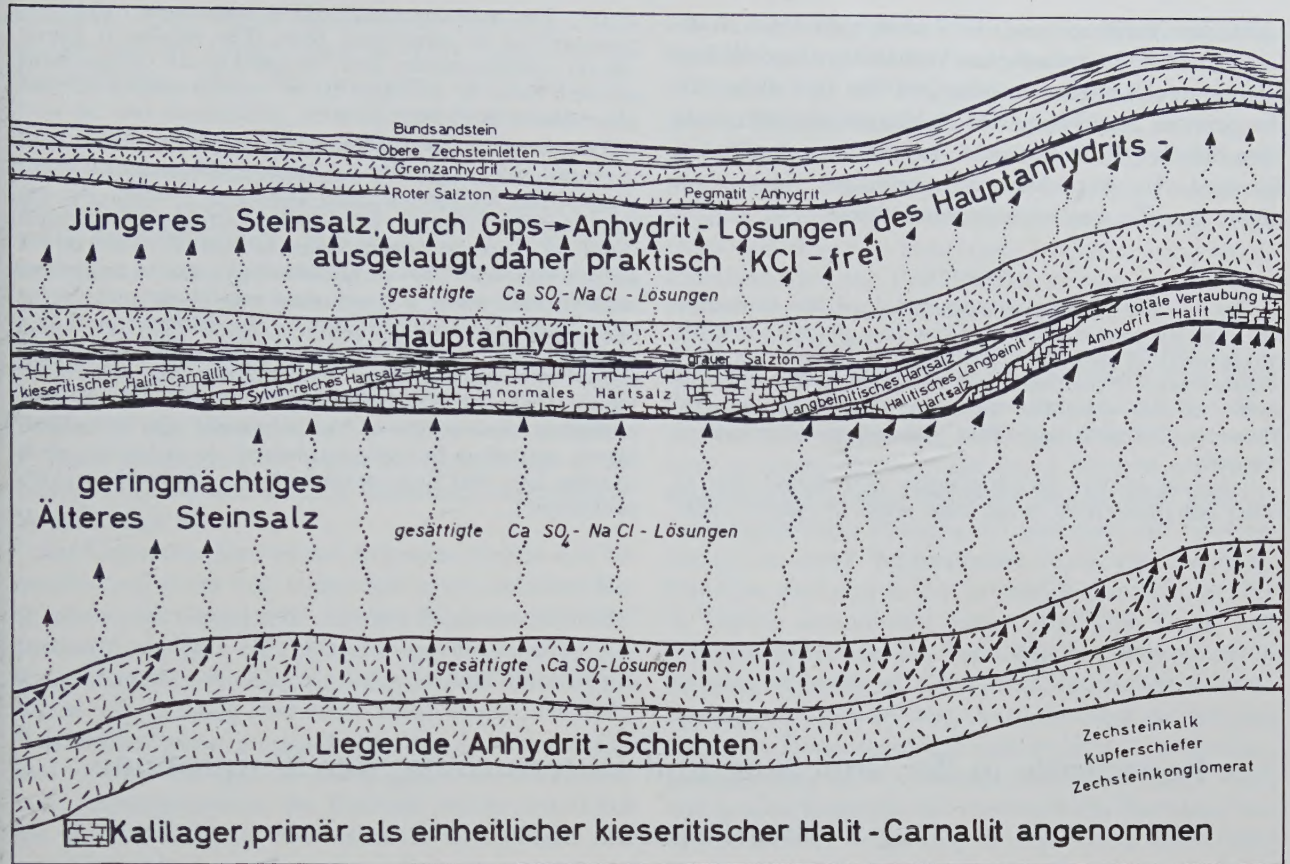


Abb. 7. Schema der Fazieswechsel und Vertaubungen der Zechstein-Kalilager, verursacht durch Gips-Anhydrit-Metamorphose-Lösungen (dargestellt für die Verhältnisse im Kalirevier des östlichen Südhazses).

rechtfertigen scheint, ist der Umstand, dass gerade die Gesteine mit besonders schönen Pseudomorphosen eng an Salz geknüpft, wenn nicht selbst NaCl-führend sind. Und da müssen wir uns, auf Grund unserer Kenntnis der Gleichgewichtsbedingungen, sagen: wenn schon aus NaCl-gesättigten Lösungen Gips ausfällt (wobei dieser sogar noch zur Idioblastese fähig ist), wieviel mehr muss dies dann für die Ausscheidung aus weniger konzentriertem Meerwasser gelten. Im übrigen haben in neuester Zeit DUNHAM<sup>1</sup> und STEWART<sup>2</sup> Strukturrelikte von Gips auch in englischen Zechstein-Anhydriten beobachtet und beschrieben und dabei auch klar Gips als Urmineral der Pseudomorphosen erkannt.

Da die unter der Salzfolge liegenden und ihr eingeschalteten Anhydrite mitunter Mächtigkeiten von mehreren hundert Metern aufweisen, müssen auch die bei ihrer Entstehung aus Gips freigesetzten Wassermengen ganz beträchtlich gewesen sein. Sie mögen, nach oben dringend, an den überlagernden Salzen bedeutende Veränderungen erwirkt – so etwa carnallitische Lager in

Hartsalz (ein Sylvin-Kieserit-Steinsalz-Gestein) –, verwandelt oder ganz weggelöst haben. In der Tat muss der Bergbau mancher Reviere sich mit zum Teil sehr unmotivierten örtlichen Veränderungen und Verarmungen der Kalilager abfinden. Vor der Deutung der Pseudomorphosengefüge und der Kenntnis ihrer allgemeinen Verbreitung neigten wir mehr dazu, die Ursache solcher Veränderungen und «Vertaubungen» in einem primären Wechsel des Abgelagerten zu suchen, und der eine von uns (BORCHERT) hat auch versucht, mit Unterbauung durch Experimente einen zur Erklärung dieses Wechsels dienlichen Abscheidungsmechanismus aufzuzeigen<sup>1</sup>. Nunmehr wird man aber gezwungen sein, den bei der Gips-Anhydrit-Umwandlung frei werdenden Wässern eine massgebliche Rolle einzuräumen. Tatsächlich lassen sich interessante Beziehungen erwarten zwischen der Mächtigkeit der beteiligten Anhydrite, den die Wegsamkeit des Gebirges für aufsteigende Laugen bestimmenden Faktoren einerseits und dem Ausmass der Veränderungen in den Salzlagern andererseits. Abbildung 7 gibt eine schematische Über-

<sup>1</sup> K. C. DUNHAM, Proc. Yorks. Geol. Soc. 27, 217 (1948).

<sup>2</sup> F. H. STEWART, The petrology of the evaporites of the Eskdale no. 2 boring, east Yorkshire. Part. I, The lower evaporite bed, Mineral. Mag. 28, 621 (1949); Part. II, The middle evaporite bed, Mineral. Mag. 29, 445 (1951); Part. III, The upper evaporite bed, Mineral. Mag. 29, 557 (1951).

<sup>1</sup> H. BORCHERT, Die Vertaubungen der Salzlagerstätten und ihre Ursachen, Teil I, Z. Kali 27, 97 (1933); Teil II, Z. Kali 28, 290 (1934); 29, 1 (1935); Teil III, Z. Kali 35, 33 (1941). – H. BORCHERT, Z. Kali 32, 132 (1938); Arch. Lagerstättenforsch., Berlin 1940, H. 67.



sicht der Vorgänge und Veränderungen eines Kalilagers, wobei die geologischen Verhältnisse im östlichen Südharzrevier zugrunde gelegt wurden und wobei für die primäre Ausbildung des Kalilagers einheitlich ein kieseritischer Halit-Carnallit angenommen worden ist. Es wird sich empfehlen, in sorgfältiger Kleinarbeit diesen Beziehungen weiter nachzuspüren.

#### Summary

The so-called "Pegmatitanhydrite" of the Germanic Permian formation owes its name to a peculiar graphic intergrowth of anhydrite with halite. As early as 1907 ZIMMERMANN recognized that this arrangement is the result of an extended pseudomorphic replacement. However ZIMMERMANN does not name a primitive mineral.

Later on similar pseudomorphs were found also in other anhydrite beds of the huge series of marine evap-

orites. The authors examined a numerous collection, representing all important beds. The results of goniometric measurements and morphological comparisons showed them in all cases to be pseudomorphs of porphyroblasts of gypsum.

The common distribution of shape relics of this kind is remarkable, especially considering the many different possibilities for their genesis and conservation. We are thus forced to suppose that calcium sulfate was precipitated as gypsum, even from saturated solutions of sodium chloride. The conversion of gypsum to anhydrite occurred only when the sediment was buried deeply by later rocks. The water set free by the different, and to a certain extent very thick, beds of anhydrite may have caused important changes upon the covering salt rocks. Especially rather sudden changes of chemical and mineralogical composition of the potassium salt bed (Kalilager), may thus be easily explained. As is known, such changes can lead to a complete lack of potassium (Ver-taubungen).

## Fortschritte in der Isolierung und Untersuchung der Blutproteine

Von R. STRÄSSLE, Basel<sup>1</sup>

### Einleitung

Die von COHN und seiner Schule während der vergangenen Kriegsjahre ausgearbeiteten Verfahren zur Isolierung einer grossen Zahl von Blutproteinen<sup>2</sup> bildeten das Ergebnis jahrelanger Untersuchungen an einfacheren Systemen, nämlich an einzelnen Aminosäuren und Peptiden sowie an Gemischen dieser Stoffe<sup>3</sup>. Eine zusammenfassende Arbeit von COHN über Entdeckung, Eigenschaften sowie klinische Verwendbarkeit einzelner Blutproteine erschien im Jahre 1947 in dieser Zeitschrift<sup>4</sup>, und zwar befasste sich der Autor im wesentlichen mit den Plasmaproteinen, weniger mit den Blutkörperchen. Die intensive Entwicklung seit dieser Zeit hat auf dem gesamten Gebiet bedeutende Fortschritte gebracht, und die Cohnsche Schule ist auch weiterhin darin führend geblieben. Zwar erstrecken sich diese Fortschritte weniger auf die Isolierung neuer, noch unbekannter Blutproteine als vielmehr auf die Verbesserung der Methoden, so dass viele der damals nur schwierig oder unzugänglichen Komponenten heute in nativer Form für Forschung und klinische

Erprobung bereitstehen. Es ist vielleicht etwas verfrüht, die klinischen Ergebnisse, welche mit Hilfe der nach neueren Methoden isolierten Blutproteine erhalten wurden, bereits heute richtig abschätzen zu wollen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher im wesentlichen die methodischen Neuerungen, die von der Cohnschen Arbeitsgruppe auf dem Gebiete der Blutfraktionierung entwickelt wurden, erwähnt werden. Diesen Ausführungen sind einige grundlegende, theoretische Erläuterungen vorangestellt.

### Zur Theorie der Cohnschen Fraktionierung

Um aus einem Proteingemisch einzelne Proteine in reiner Form isolieren zu können, ist zunächst eine Auftrennung in Hauptfraktionen nötig, deren Unterfraktionierung in vielen Fällen reine Komponenten liefert. Die präparative Auftrennung in Hauptfraktionen geschieht heute meist nach zwei Verfahren:

- a) Fraktionierte Aussalzung bei hoher Neutralsalzkonzentration.
- b) Fraktionierte Fällung bzw. Extraktion bei sehr niedrigen Salzkonzentrationen unter Zusatz wassermischbarer, organischer Lösungsmittel und unter genauer Kontrolle von pH, Ionenstärke, Temperatur und Konzentration der Zusätze.

Die Aussalzmethode wurde auf empirischer Grundlage bereits im 18. und 19. Jahrhundert entwickelt, doch ist ihre Anwendbarkeit nicht auf Proteine be-

<sup>1</sup> Wissenschaftliche Laboratorien der Hoffmann La Roche & Co., AG., Basel.

<sup>2</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>3</sup> E. J. COHN und J. T. EDSALL, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Amer. Chem. Soc. Monograph Series, Nr. 90 (Reinhold Publ. Corp., New York 1943).

<sup>4</sup> E. J. COHN, Exper. 3, 125 (1947).



schränkt. Auch ungeladene Moleküle lassen sich aus-salzen, und der Effekt hängt in erster Linie von der Molekülgrösse, dann aber von Natur und Konzentra-tion der zur Ausfällung verwendeten Neutralsalze ab. Bereits HOFMEISTER<sup>1</sup> erkannte gewisse Regelmässig-keiten zwischen Ionenart und löslichkeitsvermindern-der Wirkung, doch bleibt es das Verdienst von COHN<sup>2</sup>, durch Aufstellung seiner Aussalzgleichung die Methode auf eine sichere theoretische Grundlage gestellt zu haben. Das Verfahren besitzt jedoch den Nachteil, dass meist nur eine Variable, nämlich die Neutralsalzkon-zentration, verändert wird, wodurch die Zahl der Trennmöglichkeiten bedeutend eingeschränkt wird. Zudem ist die Methode zur Trennung sehr ähnlicher Proteine wenig geeignet, da sie auf geringfügige struk-turelle Unterschiede nicht in besonders empfindlicher Weise anspricht.

Im Gegensatz dazu ist der Arbeitsbereich in den be-sonders von COHN und seiner Schule entwickelten Me-thoden in das Gebiet sehr niedriger Neutralsalzkonzen-trationen verlegt. Hier kommt der individuelle La-dungscharakter in einer für jedes Protein spezifischen Weise zur Geltung und wird nicht durch eine hohe Salzkonzentration maskiert, wie dies in der Aussalz-methode der Fall ist. Die Abhängigkeit der Löslichkeit vom Ladungszustand der Proteine wurde erst durch die Entwicklung der theoretischen Grundlagen ver-ständlich. MELLANBY<sup>3</sup> sowie LEWIS und RANDALL<sup>4</sup> führten den Begriff der Ionenstärke ein:

Ionenstärke  $I/2 = 1/2 \sum c_i z_i^2$

$c_i$  = Konzentration der verschiedenen Ionenarten in Gramm-Ion/1000 g Lösungsmittel;  
 $z_i$  = Valenz der entsprechenden Ionen.

Diese ist verschieden von der Molarität, wie aus Tabelle I hervorgeht:

Tabelle I

Vergleich von Molarität und Ionenstärke verschiedener Salze

Salz	Molarität	Ionenstärke
NaCl . . . . .	0,1	0,1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	0,1	3 × 0,1
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,1	4 × 0,1
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,1	6 × 0,1
Fe <sup>3+</sup> -Zitrat . . . . .	0,1	9 × 0,1
Mg <sub>3</sub> (BO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,1	15 × 0,1

Die Ionenstärke repräsentiert somit die Gesamtladung aller in Lösung anwesenden Anionen und Kationen, und ihre Berücksichtigung erlaubt die Erfassung des gesamten ionalen Ladungseffektes auf die Dissoziation

der sauren und basischen Gruppen im Proteinmolekül. DEBYE<sup>1</sup> hat in seiner Gleichung der interionischen Kräfte dem Begriff der Ionenstärke vertiefte theoretische Bedeutung gegeben, und schliesslich haben SCATCHARD und KIRKWOOD<sup>2</sup> die Gleichung von DEBYE-HÜCKEL auf dipolare Ionen erweitert und so die Wechselwir-kungen zwischen Neutralsalzen, Aminosäuren, Pep-tiden und Proteinen theoretisch fundiert. Damit waren grundlegende neue Erkenntnisse gewonnen: Die Lös-lichkeit der Proteine hängt ausserordentlich stark von ihrem Ladungszustand ab, und zwar ist, genauer ausgedrückt, der Logarithmus der Löslichkeit vom Qua-drat des Dipolmomentes bzw. von elektrischen Mo-menten höherer Ordnung abhängig. Das Moment wird aber in empfindlicher Weise durch kleinste pH-Ände-rungen in der Lösung verändert, woraus folgt, dass die Löslichkeit eines Proteins auf minimale pH-Schwan-kungen in stark vergrössertem Maßstabe anspricht. Daneben wird sie von der Art und Konzentration aller in Lösung anwesenden Ionen, dipolaren Ionen und Proteine sowie von der herrschenden Dielektrizitäts-konstante beeinflusst. Es ist leicht, einzusehen, dass ein System mit fünf oder mehr Variablen eine viel grössere Zahl von Trennungsmöglichkeiten bietet als die Aus-salzmethode, wobei allerdings die zweckmässige Wahl und genaue Kontrolle der verschiedenen Variablen von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer Frak-tionierung sind. Das Grundprinzip solcher Fraktion-ierungen besteht in der Ausfällung eines Proteins in der Nähe seines isoelektrischen Punktes, wo es mini-male Löslichkeit aufweist, die durch Alkoholzusatz in der Kälte (zwecks Vermeidung von Denaturation) weiter herabgesetzt wird. Da die isoelektrischen Punkte der Begleitproteine in der Regel nicht mit demjenigen des auszufällenden Proteins zusammenfallen, die Lös-lichkeit in Abhängigkeit des pH beiderseits des iso-elektrischen Punktes aber in exponentieller Weise an-steigt, ist eine Trennung leicht zu erzielen.

Neben diesen allgemeinen, elektrochemischen Prin-zipien wird besonders in den neueren Verfahren von COHN von mehr spezifischen Wechselwirkungen zwis-chen Proteinen und Blutkörperchen einerseits, Metall-ionen, Zuckern und Polysacchariden andererseits Ge-brauch gemacht. Hierbei bilden sich entweder Metall-komplexe<sup>3</sup> oder schwerlösliche Metallsalze der Proteine, die in einem pH-Bereich ausfallen, in welchem die Natriumsalze der Proteine infolge starker Dissoziation erhöhte Löslichkeit aufweisen.

<sup>1</sup> P. DEBYE und E. HÜCKEL, *Physik. Z.* **24**, 185, 334 (1923); **26**, 22, 93 (1925).

<sup>2</sup> G. SCATCHARD und J. G. KIRKWOOD, *Physik. Z.* **33**, 297 (1932).

<sup>3</sup> C. TANFORD und M. L. WAGNER, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 434 (1953). – E. J. COHN, D. M. SURGENOR, K. SCHMID, W. H. BATCHELOR und E. H. ALAMERY, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 175. – F. R. N. GURD, J. T. EDSALL *et al.*, *Federation Proc.* **11**, 224 (1952). – *Blood Cells and Plasma Proteins*, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry, Related to Medicine and Public Health, Harvard University. No. 2. Ed.: J. L. TULLIS (Academic Press, Inc., New York).

<sup>4</sup> F. HOFMEISTER, *Arch. Exper. Path. Pharm.* **24**, 247 (1887/88).

<sup>2</sup> E. J. COHN, *Physiol. Rev.* **5**, 349 (1935).

<sup>3</sup> J. MELLANBY, *J. Physiol.* **33**, 338 (1905).

<sup>4</sup> G. N. LEWIS und M. RANDALL, *J. Amer. Chem. Soc.* **43**, 1112 (1921).



Tabelle II  
Methode 6 nach COHN

Fraktion	pH	$I/2$	%EtOH	$t^{\circ}\text{C}$	Hauptkomponenten
I	7,2	0,14	8	-3	Fibrinogen
II + III	6,8	0,09	25	-5	$\gamma$ -Globulin, $\beta$ -Lipoprotein, Prothrombin, Isoagglutinine, Pro-fibrinolysin
IV-1	5,2	0,09	18	-5	$\alpha$ -Lipoprotein, Caeruloplasmin
IV-4	5,8	0,09	40	-5	Serumesterase, eisenbindendes Globulin, $\alpha$ - und $\beta$ -Globuline
V	4,8	0,11	40	-5	Albumin, 4% $\alpha$ - und 1% $\beta$ -Globuline
VI	4,8	0,11	40	-5	Restlösung: Peptide u. a., saures Glykoprotein

### Nachteile der frühern Cohnschen Fraktionierungsmethoden

Während der Kriegsjahre wurden von der Cohnschen Arbeitsgruppe insgesamt sechs Methoden zur Fraktionierung von Plasma und in der Folgezeit zahlreiche Methoden zur Unterfraktionierung bestimmter Hauptfraktionen entwickelt. Die weitaus bekannteste ist die sogenannte Methode 6<sup>1</sup>, mit Hilfe welcher in einem sechsstufigen Arbeitsgang die in Tabelle II aufgeführten Fraktionen erhalten wurden.

Die Dauer der Gesamtoperation ist erheblich und beträgt selbst bei schichtweisem Arbeiten mehrere Tage, während welcher Zeit die Mehrzahl der Proteine in Lösung verbleibt und so dem enzymatischen Einfluss in ganz besonderem Masse ausgesetzt ist. Zudem bildet die verwendete Alkoholkonzentration, die bis zu 40 Vol.-% beträgt, selbst bei  $-5^{\circ}\text{C}$  eine nicht unerhebliche Gefahr für viele der labilen Komponenten. Der für die Fraktionierung verwendete pH-Bereich von 4,8 bis etwa 7,5 überschreitet zudem nach heutigen Ansichten die Stabilitätszone einer Anzahl von Proteinen. Doch glaubte man nach der damaligen Ansicht, salzartige Verbindungen zwischen positiv und negativ geladenen Proteinen nur dann ausschliessen zu können, wenn alle Proteine des Systems eine Überschussladung gleichen Vorzeichens aufweisen würden. Zu diesem Zwecke war es aber nötig, das pH während der Fraktionierung gelegentlich nach der sauren oder alkalischen Seite aller isoelektrischen Punkte der in der Lösung anwesenden Proteine zu verschieben.

### Die neuen Cohnschen Verfahren

Die Notwendigkeit einer Verbesserung der bisherigen Fraktionierungsverfahren drängte sich auf, und zwar in erster Linie aus der Erkenntnis, dass etliche Komponenten mit Hilfe der bisherigen Methoden nicht in nativem Zustand erhalten wurden. Dies galt besonders von den Blutkörperchen, den Enzymen, aber auch

bereits von  $\gamma$ -Globulin. So gelang es KIRKWOOD<sup>1</sup>, menschliches Plasma mit Hilfe seiner Methode der Elektrophoresekonvektion aufzutrennen, wobei er nicht mehrere, sondern nur eine einheitliche  $\gamma$ -Globulinfraktion erhielt, woraus er schloss, dass die verschiedenen von COHN und Mitarbeitern isolierten  $\gamma$ -Globulinfraktionen zum Teil Artefakte der Fraktionierung sein könnten. Der Zustand der Enzyme war durch Bestimmung ihrer Aktivität, jener der Blutkörperchen durch ihre mikroskopische Struktur sowie durch ihre Stabilität und Funktionstüchtigkeit einwandfrei kontrollierbar. Auch hier waren die Ergebnisse zum Teil unbefriedigend und liessen ein Bedürfnis nach schonenderen und zugleich selektiveren Verfahren aufkommen. Grössere Selektivität wurde durch Verwendung zweiwertiger Metall- und Erdalkalimetallionen in vorzüglicher Weise erreicht. Zudem gelang es, die Verfahren dadurch schonender zu gestalten, dass eine Äthanolkonzentration von 19 Vol.-% nicht überschritten und die Wirkung der Blutenzyme auf ein Minimum eingeschränkt wurde, letzteres durch vorherige sorgfältige Abtrennung der Blutkörperchen sowie durch sofortiges Ausfällen sämtlicher Proteine des verbleibenden Plasmas. Der für die Fraktionierung erforderliche pH-Bereich konnte ebenfalls wesentlich eingengt werden, weil im Gegensatz zu frühern Bestrebungen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen nicht vermieden, sondern vielmehr begünstigt und zur Trennung ausgenützt wurden. Solche salzartigen Bindungen zwischen Proteinen lassen sich nämlich durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante der Lösung (Glycinzusatz) leicht wieder aufspalten, da ja die Stärke der elektrostatischen Anziehung umgekehrt proportional zur Dielektrizitätskonstante ist. Um jedoch Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten schonend abtrennen zu können, dass ihr Zustand nach der Isolierung demjenigen *in vivo* nahekam, mussten die bestehenden Methoden verbessert werden. Die neuen Methoden gründen sich in erster Linie auf selektive

<sup>1</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>1</sup> J. R. CANN, R. A. BROWN, S. J. SINGER, J. B. SHUMAKER, JR., und J. G. KIRKWOOD, Science 114, 30 (1951).



*Adsorption oder auf Differentialzentrifugation unter Ausnützung der verschiedenen Dichte der Blutkörperchen.*

*Abtrennung der Blutkörperchen*

Auf Grund der Erkenntnis, dass Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten eine wichtige Quelle von Enzymen darstellen, die bei geringster Schädigung der Blutkörperchen frei werden und ihre Wirkung an den Bluteiweißstoffen als Substraten entfalten, war eine schonende Abtrennung vorgängig jeder weiteren Plasmafraktionierung unumgänglich. In ungerinnbar gemachtem Blut beobachtet man eine verschieden schnelle, jedoch spontan verlaufende Sedimentation der Erythrocyten (Blutsenkung). Durch Zusatz gewisser hochmolekularer Stoffe, besonders solcher mit fadenförmiger Struktur oder zumindest stark asymmetrischer Molekülgestalt, wie zum Beispiel Fibrinogen, Dextran usw., lässt sich die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten wesentlich erhöhen, während diejenige der Leukocyten kaum oder gar nicht beeinflusst wird. Dies hat seinen Grund in der von FÄHRAEUS<sup>1</sup> beobachteten und von verschiedenen Forschern, so zum Beispiel von MINOR und BURNETT<sup>2</sup> sowie von BUCKLEY, POWELL und GIBSON<sup>3</sup>, praktisch verwerteten Rouleauxbildung der Erythrocyten, das heisst einer Bildung von Aggregaten, wodurch der Unterschied in der Sedimentationsgeschwindigkeit beider Klassen von Blutkörperchen vergrößert wird. Die sedimentierten Erythrocyten lassen sich sodann von beigemengten Leukocyten und Thrombocyten durch Waschen mit zellfreiem Plasma befreien, was mit Vorteil in der speziell zu diesem Zwecke konstruierten «long traverse path centrifuge»<sup>4</sup> geschieht. Hierbei wird ein mit etwa 100facher Erdschwere ( $100 \times g$ , anstatt der üblichen  $2000\text{--}3000 \times g$  in Normalzentrifugen) rotierendes Gefäß von einem axialen Zufluss her mit Blut oder einer Erythrocytensuspension, von der Peripherie her mit Waschflüssigkeit gespiesen. Die Erythrocyten werden nun durch die herrschende Zentrifugalbeschleunigung an die Peripherie gedrängt und durch die leicht turbulente Strömung gewaschen, während die Waschflüssigkeit mit geringerer Dichte durch einen axialen Ausfluss kontinuierlich abgezogen werden kann. Eine sehr einfache Apparatur dieser Art wurde kürzlich von CHAPLIN und VEALL<sup>5</sup> beschrieben.

In einer andern Methode zur Trennung von roten und weissen Blutkörperchen wird die verschiedene Dichte von Plasma<sup>6</sup> ( $D = 1,026$ ), Erythrocyten ( $D = 1,090$ ) und Leukocyten ( $D = 1,065$ ) ausgenützt.

Durch Übersichten einer Serumalbuminlösung der Dichte 1,079 mit Blut und anschliessendem Zentrifugieren erreicht man, dass die Erythrocyten die Albuminschicht passieren und sedimentieren, während sich die Leukocyten an der Grenzschicht zwischen Plasma und Serumalbuminlösung ansammeln, wobei sie leider gerne zusammenklumpen und sich dann nur schwierig erneut dispergieren lassen.

Da die Thrombocyten mit der Dichte 1,030 noch weniger leicht sedimentieren als die Leukocyten, hat es nicht an Versuchen gefehlt, nach Entfernung der Erythrocyten die beiden Zellsorten durch verschieden intensives Zentrifugieren zu trennen<sup>1</sup>. MINOR und BURNETT<sup>2</sup> verwendeten Dextran zur Rouleauxbildung, dazu ein Netzmittel, um später eine bessere Dispergierbarkeit der Plättchen zu gewährleisten. Nach Abhebern des Plasmas wurden daraus zunächst Leukocyten und Thrombocyten zusammen während 30 min bei 2000 U./min abzentrifugiert, worauf nach erneutem Suspensieren des Sediments erst die Leukocyten und verbleibenden Erythrocyten während 7 min bei 800 U./min, schliesslich aus der überstehenden Lösung die Thrombocyten bei 2000 U./min während 30 min abzentrifugiert wurden. Da die Angabe der Tourenzahl einer Zentrifuge keine Auskunft über die herrschende Zentrifugalbeschleunigung gibt, ist es unerlässlich, die verwendeten Zentrifugalbeschleunigungen als Multiple der Erdbeschleunigung auszudrücken. DILLARD, BRECHER und CRONKITE<sup>3</sup> benützten Äthylendiamin-Tetraacetat (Sequestrene) als Antikoagulans und zentrifugierten bei 30facher Erdbeschleunigung ( $30 \times g$ ) während 50 min erst die Erythrocyten und die Hauptmenge der Leukocyten, dann bei  $300 \times g$  während 50 min die Thrombocyten ab. In einem der Cohnschen vollautomatischen Verfahren, in welchem die sogenannte «falling-film centrifuge»<sup>4</sup> verwendet wird, gelangen die Leukocyten bei  $100 \times g$ , die Thrombocyten bei  $400 \times g$  zur Abscheidung. Hierbei wird das von oben in die Zentrifuge einfließende Plasma an der Wand einer mit  $100 \times g$  rotierenden Trommel fein versprüht, während das nachfolgende Plasma in dünner Schicht über diesen Plasmafilm gleitet, wobei infolge der geringen Schichtdicke die Leukocyten fortlaufend abzentrifugiert werden. Das verbleibende, plättchenreiche Plasma fliesst in die darunterliegende, unabhängig von der obern mit  $400 \times g$  rotierende Trommel, in deren Oberteil die Thrombocyten auszentrifugiert werden, während dank einer eingebauten Trennwand das im untern Teil sich ansammelnde, zellfreie Plasma diskontinuierlich abgezogen werden kann.

<sup>1</sup> R. FÄHRAEUS, Acta med. Scand. 55, 1 (1921).

<sup>2</sup> A. H. MINOR und L. BURNETT, Blood 3, 799 (1948).

<sup>3</sup> E. S. BUCKLEY, JR., M. T. POWELL und J. G. GIBSON, Federation Proc. 8, 18 (1949).

<sup>4</sup> E. S. BUCKLEY, JR., J. G. GIBSON, M. D. D'HONT und R. J. TINCH, Proc. 2<sup>nd</sup> Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston (USA.).

<sup>5</sup> H. CHAPLIN und N. VEALL, Lancet 264, H. 1, 218 (1953).

<sup>6</sup> B. L. VALLEE, W. L. HUGHES, JR., und J. G. GIBSON, Blood, Special Issue 1, 82 (1947).

<sup>1</sup> T. R. WAUGH und D. W. RUDDICK, Canad. Med. Assoc. J. 51, 11 (1944).

<sup>2</sup> A. H. MINOR und L. BURNETT, Blood 7, 693 (1952).

<sup>3</sup> G. H. L. DILLARD, G. BRECHER und E. P. CRONKITE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 78, 796 (1951).

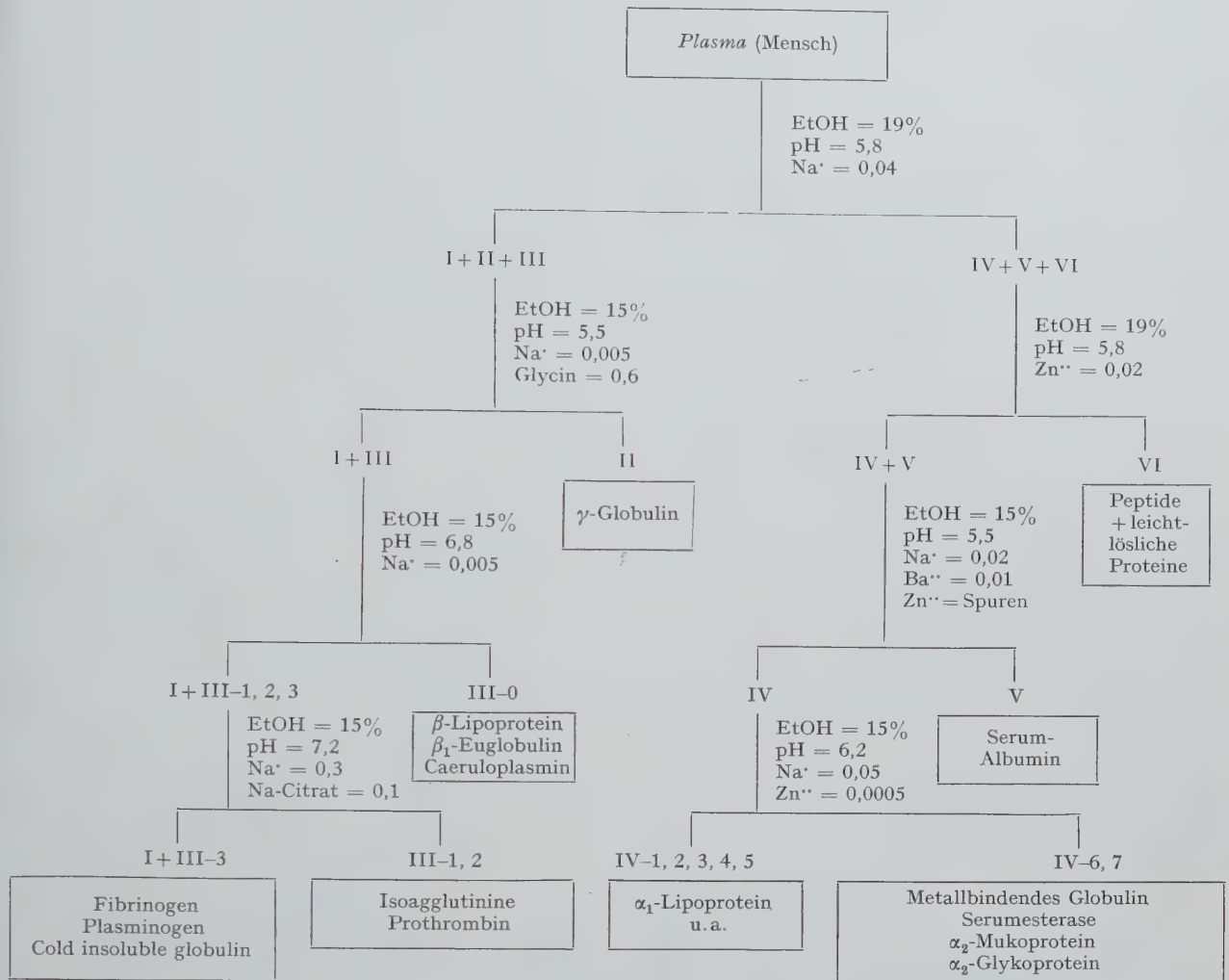
<sup>4</sup> C. L. EMERSON, JR., Proc. 2<sup>nd</sup> Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston, Mass. (USA.).







Tabelle III  
Methode 10 (COHN\*)



\* E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

Trocknung der isolierten Fraktionen durch Austauschharze oder durch Dialyse (zum Beispiel gegen Äthylen-diamin-Tetraacetatlösung) entfernt werden. Ferner ist die Entfernung der beträchtlichen Glyzinnengen durch Dialyse oder Umfällung angezeigt. Die Methode wurde von LEVER und Mitarbeitern<sup>1</sup> für die Fraktionierung von 5 cm<sup>3</sup> Plasma unter Anwendung von Filtration in der Kälte modifiziert und ist somit auch zur Untersuchung individueller Plasmaproben bei klinischen Studien verwendbar.

b) *Vollautomatisches Verfahren*. Neueren Datums sind Bestrebungen, auf den Gebrauch von Alkohol als Fällungsmittel und damit auf Temperaturen unter null Grad zu verzichten, um dafür spezifische Reaktionen zwischen den Plasmaproteinen einerseits, Metallionen

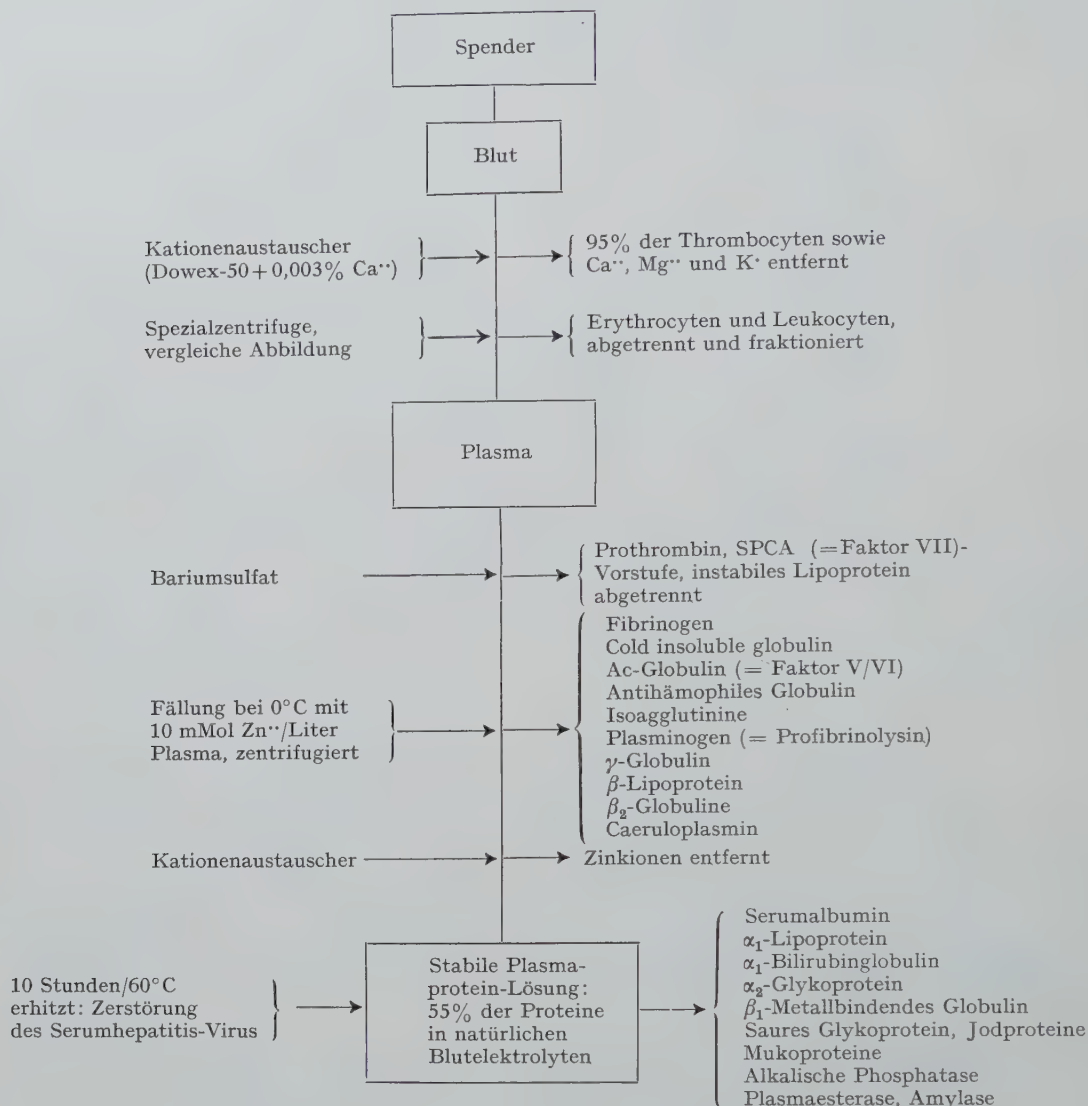
und Zuckern andererseits auszunützen<sup>1</sup>. Das Verfahren schliesst sich direkt an die im Vorgehenden erwähnte Methode der Adsorption von Thrombocyten an Austauschharze mit anschliessender Trennung der Erythrocyten und Leukocyten in der in der Abbildung schematisch dargestellten Zentrifuge an. Das zellfreie Plasma mit einer Temperatur von 0°C wird anschliessend in einem geschlossenen, sterilen System gemäss der in Tabelle IV wiedergegebenen Weise in eine γ-Globulin enthaltende Fällung und in die sogenannte «stable plasma protein solution» aufgetrennt, die entweder direkt oder nach weiterer Unterfraktionierung verwendet werden können.

<sup>1</sup> W. F. LEVER, F. R. N. GURD, E. UROMA, R. K. BROWN, B. A. BARNES, K. SCHMID und E. L. SCHULTZ, J. Clin. Invest. 30, 99 (1951).

<sup>1</sup> E. J. COHN, J. L. TULLIS, D. M. SURGENOR und M. D. D'HONT, Science 114, 479 (1951). — *Blood Cells and Plasma Proteins*, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard University, No. 2. Ed.: J. L. TULLIS (Academic Press, Inc., New York).



Tabelle IV  
Vollautomatisches Verfahren (COHN\*)



\* E. J. COHN, J. L. TULLIS, D. M. SURGENOR und M. D. D'HONT, Science 114, 479 (1951).

#### Stabilität verschiedener Bluteiweisskörper

Die Blutkörperchen müssen hinsichtlich ihrer Stabilität in einer andern Gruppe eingereiht werden als die Plasmaproteine, da sie als Blutzellen Gebilde darstellen, welche noch einen eigenen Stoffwechsel haben. Jede Isolierung und Konservierung der Blutkörperchen setzt somit voraus, dass man diesem Umstand Rechnung trage, da die Zellen ja sehr bald funktionsuntüchtig werden und zugrunde gehen, weil einzelne ihrer gekoppelten Enzymsysteme infolge Mangels an Substrat, Coenzym oder aus andern Gründen inaktiviert werden. So schreitet die Glykolyse als wichtigste Stoffwechselreaktion der *Erythrocyten* auch im Zustand der Konservierung unter Bildung von Milchsäure fort, weshalb man dem Blut Glukose zusetzt, um diese Reaktion zu unterhalten. Der Gedanke war naheliegend, durch Lagerung bei tieferer Temperatur und

damit Verlangsamung des Stoffwechsels die Haltbarkeit der Erythrocyten zu verbessern, was sich tatsächlich im Bereiche von 4 bis 10°C bewährte. Bei Temperaturen unter null Grad tritt Hämolyse ein, falls nicht durch sehr schnelle Tiefkühlung die Bildung von Eiskristallen vermieden und die Erstarrung des Wassers in amorpher Form begünstigt wird. Tiefkühlung in glycerinhaltigen Lösungen ist heute eine vielverwendete Methode der Konservierung von Erythrocyten<sup>1</sup>, obwohl zur Vermeidung von Hämolyse beim Auftauen besondere Vorsichtsmassregeln beobachtet werden müssen<sup>2</sup>.

*Leukocyten* sind wesentlich instabiler; ihre Lebensdauer beschränkt sich auf Stunden und nicht auf Tage

<sup>1</sup> A. U. SMITH, Lancet 249, H. 2, 910 (1950). – H. A. SLOVITER, Lancet 260, H. 1, 823, 1350 (1951).

<sup>2</sup> J. E. LOVELOCK, Lancet 262, H. 1, 1238 (1952). – H. CHAPLIN und N. VEALL, Lancet 264, H. 1, 218 (1953).



oder Monate. Citrat hat gegenüber Leukocyten besonders hinsichtlich der Phagocytosefähigkeit einen ungünstigen Einfluss, und in citrathaltigen Blutkonserven sind diese Zellen denn auch bereits nach zwei Tagen morphologisch und funktionell stark geschädigt. Dagegen erhöhen Plasmaproteine die Stabilität der Leukocyten. Leukocytenkonzentrate aus Citratblut haben in Fällen von Agranulocytose ihren günstigen Einfluss auf die Leukopenie erwiesen<sup>1</sup>.

Die Thrombocyten spielen bei der Blutgerinnung bekanntlich eine grosse Rolle. Sie bilden die am wenigsten stabile Gruppe von Blutkörperchen, da sie bereits im Kontakt mit benetzbaren Oberflächen zusammenklumpen und zerfallen, was auf Grund der Ansicht verschiedener Autoren die nachfolgende Blutgerinnung auslöst, indem mehrere Substanzen in Freiheit gesetzt werden, welche die Prothrombinumwandlung beschleunigen<sup>2</sup>. Durch Arbeiten in Gefässen mit nichtbenetzbaren Oberflächen (Paraffin, Silikon, Kunststoffe) kann diesem Übelstande begegnet werden. Da die gebräuchlichen Verfahren der Blutgewinnung und Konservierung die Thrombocyten nicht intakt lassen, ist eine Verbesserung der Methoden angezeigt, wobei folgende Punkte an erster Stelle berücksichtigt werden müssen: Painliche Technik der Blutentnahme, Verwendung decalcifizierender Antikoagulantien, Arbeiten bei niedrigen Temperaturen und Ausschluss benetzbarer Oberflächen. Hinsichtlich der optimalen Konservierungsbedingungen ist noch sehr wenig bekannt. Intakte, funktionstüchtige Thrombocyten kommen in erster Linie für die Therapie der thrombocytopenischen Purpura in Frage.

Die Stabilität der Plasmaproteine ist sehr unterschiedlich, weshalb kaum ein Reagens oder eine Methode zu finden sein wird, die zum Beispiel zur Sterilisation sämtlicher Plasmae weisskörper geeignet sind<sup>3</sup>. Unter den Plasmaproteinen ist wohl das Albumin eines der stabilsten Proteine, während Fibrinogen in Lösung eine bedeutend geringere Stabilität aufweist. Albuminlösungen lassen sich nach Zusatz von Stabilisatoren durch zehnstündiges Erhitzen auf 60°C sterilisieren, was für die Zerstörung des allfällig anwesenden Serumhepatitis-Virus von grosser Bedeutung ist. Andere Proteine sind weniger hitzestabil. Prothrombin und Leukocyten lassen sich durch ultraviolette Bestrahlung sterilisieren, während die gleiche Behandlung einen nach-

teiligen Einfluss auf die Stabilität von Albumin und Fibrinogen hat. Zur Sterilisation des Fibrinogens soll Stickstofflost (nitrogen mustard) geeignet sein.

In geeigneter Form und im trockenen Zustand sind jedoch sämtliche Plasmaproteine hinlänglich stabil, besonders bei Lagerung in der Kälte und in verschlossenen Gefässen.

#### *Fortschritte in der Charakterisierung bereits bekannter Plasmaproteine*

Da seit der Zeit von 1947 die Entwicklungen sich nicht allein auf die Ausarbeitung neuer Methoden zur Blutfraktionierung, sondern ebenfalls auf die Untersuchung bekannter, aber noch ungenügend charakterisierter Plasmaproteine erstreckte, sollen hier in Kürze die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst werden. Die dabei zur Sprache kommenden Proteine umfassen  $\beta$ -Lipoprotein, Serumesterase, metallbindendes Globulin, ein saures Glykoprotein sowie die Komponenten der Blutgerinnung. Untersuchungen an weiteren Plasmaproteinen sind hier nur noch angedeutet, da sie weniger zur Charakterisierung und bereits im Zusammenhang mit andern Problemen ausgeführt wurden.

a)  $\beta$ -Lipoprotein<sup>1</sup>. Als Ausgangsmaterial diente Fraktion III-0, gewonnen nach Methode 6<sup>2</sup> oder 9<sup>3</sup>, oder eine entsprechende Fraktion nach Methode 10<sup>4</sup>, aus welcher nach einer Vorreinigung reines  $\beta$ -Lipoprotein dadurch gewonnen wurde, dass die Lösung durch präparative Ultrazentrifugation während 6 h bei 45000 U./min ( $120000 \times g$ ) in einem Medium hoher Dichte in fünf verschiedene Phasen aufgetrennt wurde, wobei sich das  $\beta$ -Lipoprotein durch Flotation in der zweitobersten Phase anreicherte.

Das 5% der Plasmaproteine umfassende  $\beta$ -Lipoprotein besteht zu 75% aus Lipoiden und zu 25% aus Protein, weist ein Löslichkeitsminimum bei pH 5,4 und ein Molekulargewicht von 1300000 auf. Da es beim Gefrieren oder Gefriertrocknen in irreversibler Weise zerstört wird, weil offenbar die letzten Anteile von Wasser als Hydratationswasser eine wichtige Funktion in der Bindung der Lipoid- und Polypeptidreste haben, muss  $\beta$ -Lipoprotein in wässriger Lösung nahe beim Gefrierpunkt aufbewahrt werden. Der Nachweis von Spuren von Oestriol,  $\beta$ -Carotin, Vitamin A und E in hochgereinigtem  $\beta$ -Lipoprotein machen dessen Funktion der Aufrechterhaltung eines gewissen Plasma-

<sup>1</sup> M. M. STRUMIA, Amer. J. Med. Sci. 187, 527 (1934).

<sup>2</sup> A. G. WARE, J. L. FAHEY und W. H. SEEGER, Amer. J. Physiol. 154, 140 (1948). – A. G. WARE und W. H. SEEGER, J. Biol. Chem. 172, 699 (1948). – R. I. MC CLAUGHRAY und W. H. SEEGER, Blood 5, 303 (1950). – S. A. JOHNSON, Amer. J. Physiol. 170, 631 (1952). – A. J. QUICK, Amer. J. Physiol. 115, 317 (1936). – R. FEISSLY und M. ENOWICZ, Schweiz. med. Wschr. 76, 274 (1944). – R. FEISSLY, Helv. med. Acta 12, 215 (1945). – C. L. CONLEY, R. C. HARTMANN und W. I. MORSE, J. Clin. Invest. 28, 340 (1949). – A. FONIO, Commun. 3<sup>rd</sup> Internat. Congr. Haematol. – P. SOULIER und LE BOLLOCH, Sem. Hôp. 26, 3702 (1950). – S. VAN CREVELD und M. M. PAULSEN, Lancet 261, H. 2, 242 (1951); 262, H. 1, 23 (1952).

<sup>3</sup> E. J. COHN, Proc. 2<sup>nd</sup> Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston, Mass. (USA.).

<sup>1</sup> J. L. ONCLEY, F. R. N. GURD und M. MELIN, J. Amer. Chem. Soc. 72, 458 (1950). – J. L. ONCLEY, F. R. N. GURD, D. GITLIN, F. W. J. TEALE und A. V. GOSSARD, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 401.

<sup>2</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>3</sup> J. L. ONCLEY, M. MELIN, D. A. RICHERT, J. W. CAMERON und P. M. GROSS, JR., J. Amer. Chem. Soc. 71, 541 (1949).

<sup>4</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).



spiegels dieser und ähnlicher Substanzen wahrscheinlich. Durch Extraktion mit Alkohol-Äther-Mischungen lassen sich die Lipide zu 99% entfernen, das zurückbleibende Protein verliert seinen Euglobulincharakter und wird wasserlöslich. Im Zusammenhang eines  $\alpha$ - und eines  $\beta$ -Lipoproteins bestimmter Zusammensetzung sind vielleicht die Untersuchungen von GOFMAN und seiner Arbeitsgruppe von Bedeutung<sup>1</sup>. Hier wird ebenfalls durch Ultrazentrifugieren in Medien höherer Dichte das Vorhandensein von Plasmakomponenten bewiesen, die mit verschiedener Geschwindigkeit nach der Oberfläche wandern, das heisst flottieren, und die einzelnen Komponenten werden durch ihre  $S_r$ -Werte (Svedberg-Einheiten der Flotation) charakterisiert. Es steht damit fest, dass der prozentuale Anteil verschiedener  $S_r$ -Klassen von Lipoproteinen nach Mahlzeit, Alter, Gesundheitszustand und anderen Faktoren stark variiert, wobei interessanterweise eine besondere Korrelation zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen an  $S_r$ 12–20-Komponenten und Arteriosklerose festgestellt wurde. Von grosser praktischer Bedeutung ist zudem die Eigenschaft des Heparins, solche gefährlichen  $S_r$ -Klassen von Lipoproteinen *in vivo* in ungefährliche Klassen von niedrigem  $S_r$ -Wert überzuführen, wobei Heparin offenbar mit einer andern Plasmakomponente unter Bildung des sogenannten «clearing factor» reagiert<sup>2</sup>, jenes Faktors, der lipämische Plasma klärt. Dieser Faktor wurde in der Cohnschen Fraktion III-1, 2, 3 und zum Teil in den Fraktionen III-0 und I, seine Vorstufe in Fraktion IV-1 und ein für das System wichtiger Cofaktor in Fraktion III-0 nachgewiesen.

b) *Serumesterase*<sup>3</sup>. Die unspezifische Cholinesterase oder Serumesterase wurde aus der nach Methode 6<sup>4</sup> gewonnenen Fraktion IV-4 isoliert, indem aus dieser durch Dialyse oder starkes Verdünnen eine lipoidreiche Fällung abgetrennt wurde und dabei eine Lösung mit hohem Gehalt an Serumesterase und metallbindendem Globulin zurückblieb. Aus dieser Lösung liess sich die Esterase als Fraktion IV-6 mit einem Minimum an Verunreinigungen bei  $-5^\circ\text{C}$ , pH 4,7, Ionenstärke 0,02 und 18% Äthanol ausfällen. Sie weist ein Löslichkeitsminimum bei pH 4,9 auf. Bei diesem pH-Wert beobachtet man eine tausendfache Zunahme der Löslichkeit beim Erhöhen der Ionenstärke von 0,02 auf 0,10.

Es sei hier kurz daran erinnert, dass die Erythrocyten<sup>1</sup> und Thrombocyten<sup>2</sup> spezifische Acetylcholinesterase enthalten, deren präparative Gewinnung praktisch ebenso wichtig ist wie diejenige der unspezifischen Serumesterase. Neuerdings wird Serumesterase als Antagonist und somit zur Steuerung des Succinylcholins verwendet, das seinerseits zur Muskeler schlaffung während der Anästhesie Anwendung findet<sup>3</sup>.

c) *Metallbindendes Globulin*. Die meisten Versuche wurden mit der nach Methode 6<sup>4</sup> aus Fraktion IV-4 isolierten Fraktion IV-7<sup>5</sup>, welche zu 76% aus metallbindendem Globulin besteht, aber auch mit entsprechenden, nach neueren Methoden hergestellten Fraktionen ausgeführt. Nach Abtrennung des Lipoproteins (Fraktion IV-5) und der Serumesterase (Fraktion IV-6) aus der Ausgangsfraktion IV-4 lässt sich eine Rohfraktion des metallbindenden Globulins (Fraktion IV-7) bei  $-5^\circ\text{C}$ , pH 5,9, Ionenstärke 0,09 und 40% Äthanol ausfällen. Die weitere Reinigung<sup>6</sup> besteht in der Ausfällung von Verunreinigungen bei  $-5^\circ\text{C}$ , pH 4,3–4,5, Ionenstärke 0,10 und 25% Äthanol, worauf metallbindendes Globulin als Fraktion IV-7,2 mit einer Reinheit von 90 bis 95% und in einer Ausbeute von 0,42 g/l Plasma (70% des metallbindenden Globulins in Fraktion IV-7) bei  $-5^\circ\text{C}$ , pH 6,2, Ionenstärke 0,24 und 40% Äthanol ausgefällt werden kann. Das Protein zeigt in Form des  $\text{Fe}^{++}$ -Komplexes zehnmal grössere Löslichkeit als im eisenfreien Zustand, während Kupferionen die Löslichkeit nicht erhöhen. Zur Bestimmung dient die charakteristische Absorption des  $\text{Fe}^{++}$ -Komplexes bei 435 m $\mu$  oder diejenige des  $\text{Cu}^{++}$ -Komplexes bei 460 m $\mu$ . Das metallbindende Globulin, welches auch im kristallisierten Zustande erhalten wurde<sup>8</sup>, gehört elektrophoretisch zur Gruppe der  $\beta_1$ -Globuline, hat ein Molekulargewicht von 90000 und einen isoelektrischen Punkt nahe bei 5,9. Auf Grund seiner Fähigkeit, je Molekül zwei Eisen- oder Kupferionen zu binden, wird es für den Transport dieser Metallionen im Plasma verantwortlich gemacht<sup>7</sup>.

d) *Saures Glykoprotein und andere sehr leicht lösliche Komponenten*. Nach Abtrennung des Albumins als fünfte Fraktion nach Methode 6 verbleibt eine Lösung, die nur sehr leicht lösliche Proteine, Peptide und andere Moleküle, wie Aminosäuren, Hormone usw., enthält.

<sup>1</sup> J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN und H. ELLIOTT, J. Biol. Chem. 179, 973 (1949). – J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, H. ELLIOTT, W. MANTZ, J. HEWITT, B. STRISOWER und V. HERRING, Science 111, 166, 186 (1950). – J. W. GOFMAN, H. B. JONES, F. T. LINDGREN, T. P. LYON, H. A. ELLIOTT und B. STRISOWER, Circulation 2, 161 (1950). – J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, H. B. JONES, T. P. LYON und B. STRISOWER, J. Gerontol. 6, 105 (1951). – F. T. LINDGREN, H. A. ELLIOTT und J. W. GOFMAN, J. Phys. Coll. Chem. 55, 80 (1951).  
<sup>2</sup> C. B. ANFINSON, E. BOYLE und R. K. BROWN, Science 115, 583 (1952).

<sup>3</sup> D. M. SURGENOR, L. E. STRONG, H. L. TAYLOR, R. S. GORDON, Jr., und D. M. GIBSON, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1223 (1949). – V. P. WHITTAKER, Physiol. Rev. 31, 312 (1951). – R. G. O. KEKWICK, M. E. MACKAY und N. H. MARTIN, Biochem. J. 53, XXXVI (1953).

<sup>4</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, Jr., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>5</sup> J. A. COHEN und M. G. P. J. WARRINGA, Biochim. Biophys. Acta 10, 195 (1953). – C. A. ZITTLE, E. S. DELLA MONICA und J. H. CUSTER, Federation Proc. 11, 316 (1952).

<sup>6</sup> J. ZAJIČEK und N. DATTA, Acta Haematol. 7, 39 (1952).

<sup>7</sup> F. F. FOLDES, T. S. MACHAJ, R. D. HUNT, P. G. McNALL und P. C. CARBERRY, J. Amer. Med. Assoc. 150, 1559 (1952). – R. J. HAMER HODGES, Lancet 264, H. 1, 143 (1953).

<sup>8</sup> Siehe Note 4, linke Spalte.

<sup>9</sup> D. M. SURGENOR, L. E. STRONG, H. L. TAYLOR, R. S. GORDON, Jr., und D. M. GIBSON, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1223 (1949).

<sup>10</sup> B. A. KOECHLIN, J. Amer. Chem. Soc. 74, 2649 (1952).

<sup>11</sup> D. M. SURGENOR, B. A. KOECHLIN und L. E. STRONG, J. Clin. Invest. 1, 73 (1949). – A. L. SCHADE, R. W. REINHART und H. LEVY, Arch. Biochem. 20, 170 (1949). – C. G. HOLMBERG und C. B. LAURELL, Acta chem. Scand. 1, 944 (1947).



Die Fraktionierung dieser Restlösung wurde kürzlich beschrieben<sup>1</sup>. Hierbei wurden sämtliche sich noch in Lösung befindenden Proteine, darunter auch das saure Glykoprotein (Fraktion VI), durch Zusatz von Zinkhydroxyd ausgefällt. Aus der überstehenden Lösung liessen sich Polysaccharide mit spezifischer Blutgruppenaktivität mittels Calciumhydroxyds als Fraktion VII gewinnen, während hierauf Aminosäuren und Peptide mit Hilfe von Ionenaustauschern als Fraktion VIII abgetrennt wurden. Die Restlösung liess sich noch in eine lipophile Fraktion IX und eine hydrophile Fraktion X auftrennen.

Bei der Unterfraktionierung von Fraktion VI wurde zuerst eine Vorfraktion VI-3 bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 5,8, 19% Äthanol und 0,5 M Zinkacetat, hierauf eine zweite Vorfraktion VI-2 bei pH 6,1, 0,02 M Bariumacetat unter sonst gleichen Bedingungen ausgefällt. Zur Abscheidung des sehr leicht löslichen Glykoproteins (Fraktion VI-1) war es nötig, die Temperatur auf  $-18^{\circ}\text{C}$  zu erniedrigen und die Äthanolkonzentration auf 35% zu erhöhen. Dieses Protein, welches in 93%iger Reinheit erhalten wurde, hat einen isoelektrischen Punkt von 2,7 und besteht nur zu 66% aus Polypeptidmaterial. Von den restlichen 34% entfallen 17,2% auf Hexose, 11,5% auf Hexosamin und 1,2% auf Phosphorsäure. Im normalen Plasma beträgt seine Konzentration 0,5 g/l. Das Glykoprotein wurde als Bleisalz kristallisiert. Durch seine Zusammensetzung und seine physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheidet sich dieses eigenartige Protein somit deutlich von den übrigen Plasmaproteinen.

e) *Komponenten der Blutgerinnung*<sup>2</sup>. Es können hier nur die wichtigsten und mit der Entwicklung der besprochenen Methoden in Zusammenhang stehenden Punkte dieses sehr ausgedehnten Gebietes berücksichtigt werden.

Um die Gerinnungskomponenten in unverändertem Zustand isolieren zu können, waren besonders zwei Neuerungen der Cohnschen Verfahren ausserordentlich wichtig: Die Vermeidung der Lyse von Thrombocyten durch strikte Verwendung von Kanülen, Schläuchen und Gefässen mit unbenetzbarer Oberfläche sowie die Entfernung von Calciumionen und Thrombocyten durch Austauschharze. Besonders hier hatte die Abkürzung der Verfahren von etwa 72 h auf wenige Minuten seine günstigen Auswirkungen. In der nach Methode 10<sup>3</sup> unter Ausschluss von Citrat und mit allen Vorsichtsmassregeln durchgeführten Fraktionierung von Plasma wurden folgende für die Blutgerinnung wichtigen Komponenten in einzelnen Fraktionen lokalisiert und zum Teil isoliert (Tab. V).

Tabelle V  
Blutgerinnungskomponenten, isoliert nach Methode 10<sup>1</sup>

Komponente	angereichert in	Menge d. Fraktion in % der Plasmaproteine
Prothrombin SPCA-(= Faktor VII-)Vorstufe	BaSO <sub>4</sub> -Adsorbat	1,0
Fibrinogen Antihämophiles Globulin Plasminogen (Profibrinolysin)	Fraktion I	3,8
Plasmininhibitor (Antifibrinolysin)	Fraktion II	(7,0)
Ac-Globulin (Faktor V/VI)	Fraktion III	(19,0)
Heparinkomplement (in $\alpha$ -Lipoproteinfraktion)	Fraktion IV	(13,0)

f) *Weitere Untersuchungen*. Die Isolierung und Reinigung von Fibrinogen aus menschlichem Plasma wurde bereits 1948 beschrieben<sup>2</sup>. Neueren Datums ist die Beschreibung eines modifizierten Verfahrens zur Gewinnung von Rinderfibrinogen<sup>3</sup>. Vergleichende Untersuchungen über so gewonnene Fibrinogenpräparate aus Menschen- und Rinderplasma wurden kürzlich publiziert<sup>4</sup>. Detailstudien an Antikörpern, Isoagglutininen und weiteren Plasmaproteinen wurden durch die Forschungen im Zusammenhang mit der Entwicklung neuerer Fraktionierverfahren etwas in den Hintergrund gedrängt. Dagegen sind in der Zwischenzeit Untersuchungen über die Modifikation von Serumalbumin ausgeführt worden. Es gelang, die Lysyl- $\epsilon$ -Aminogruppen von Albumin mit O-Methylisoharnstoff in Guanidiniumgruppen überzuführen<sup>5</sup>, die Tyrosyl- und Histidylgruppen in abgestufter Weise zu jodieren und die jodierten Serumalbumine zu kristallisieren<sup>6</sup>, die freien Carboxylgruppen durch Diazoacetamid oder Methyl diazoacetat unter Bildung von Glykolsäurederivaten in selektiver Weise zu blockieren<sup>7</sup> und die Sulfhydrylgruppen zweier Albuminmoleküle mittels Quecksilberionen<sup>8</sup> oder einer bifunktionellen Quecksilberverbindung<sup>9</sup> unter Bildung von Albumindimeren in reversibler Weise zu verknüpfen. Schliesslich wurde

<sup>1</sup> K. SCHMID, J. Amer. Chem. Soc. 72, 2816 (1950); 75, 60 (1953).  
<sup>2</sup> D. M. SURGENOR, B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN und K. SCHMID, J. Phys. Coll. Chem. 55, 94 (1951).  
<sup>3</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

<sup>1</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).  
<sup>2</sup> P. R. MORRISON, J. T. EDSALL und S. G. MILLER, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3103 (1948).  
<sup>3</sup> P. R. MORRISON, S. SHULMAN und W. F. BLATT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 78, 653 (1951).  
<sup>4</sup> J. T. EDSALL, 120. Kongress Amer. Chem. Soc. und 12. Internat. Kongress reine angew. Chem., New York 1951. - Ref.: Angew. Chem. 64, 338 (1952).  
<sup>5</sup> W. L. HUGHES, Jr., H. A. SAROFF und A. L. CARNEY, J. Amer. Chem. Soc. 71, 2476 (1949).  
<sup>6</sup> W. L. HUGHES, Jr., und R. STRÄSSLE, J. Amer. Chem. Soc. 72, 452 (1950).  
<sup>7</sup> P. E. WILCOX, 120. Kongr. Amer. Chem. Soc. und 12. Internat. Kongr. reine angew. Chem., New York 1951. - Ref.: Angew. Chem. 64, 338 (1952).  
<sup>8</sup> W. L. HUGHES, Jr., J. Amer. Chem. Soc. 69, 1836 (1947).  
<sup>9</sup> R. STRÄSSLE, J. Amer. Chem. Soc. 73, 504 (1951). - J. L. ONCLEY, W. L. HUGHES, Jr., F. R. N. GURD und H. M. DINTZIS, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 185.



die Darstellung einer grossen Anzahl sehr schön und verschiedenartig kristallisierter Metallkomplexsalze von Serumalbumin beschrieben<sup>1</sup> und über röntgenographische Untersuchungen an diesen kristallisierten Albuminderivaten berichtet<sup>2</sup>. Es würde jedoch zu weit führen, auf Einzelheiten dieser Untersuchungen einzugehen, und es muss daher auf die vermerkten Literaturstellen verwiesen werden.

<sup>1</sup> J. LEWIN, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3906 (1951).

<sup>2</sup> B.W. LOW und E.J. WEICHEL, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3911 (1951).

### Summary

Recent advances in the development of procedures for the fractionation of human blood have been reviewed, with a short introduction stressing the underlying theoretical basis of such procedures. Due consideration has been given to the isolation of the formed elements, obtained for the first time in a state resembling that of nature. Furthermore, some detailed investigations upon plasma proteins obtained by the older and by newer methods have been reviewed.

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### Les cas d'exception au théorème de LAPLACE sur les perturbations séculaires des éléments vectoriels des orbites planétaires

Les équations héliocentriques de chacune des planètes perturbées dans le problème des  $n$  corps s'écrivent grâce aux vecteurs

$$\mathcal{C} = [\mathbf{r} \mathbf{v}] = \left[ \mathbf{r} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \right], \quad |\mathcal{C}| = C; \quad |\mathcal{D}| = D; \quad |\mathbf{r}| = r,$$

$$\mathcal{D} = [\mathbf{v} \mathcal{C}] - \frac{\mu}{r} \mathbf{r}, \quad \mu = f(m_{\odot} + m),$$

sous la forme<sup>1</sup>

$$\begin{aligned} \left[ \mathcal{D} \frac{d\mathcal{C}}{dt} \right] - \frac{\mu^2 - D^2}{C^2} \cdot \frac{D^2}{C^2} \mathcal{C} \frac{d\tau}{dt} + D^2 \text{grad}_{\mathcal{C}} R &= 0, \\ \left[ \mathcal{D} \frac{d\mathcal{D}}{dt} \right] - \frac{D^2}{C^2} \mathcal{D} \frac{d\tau}{dt} + D^2 \text{grad}_{\mathcal{D}} R &= 0, \end{aligned} \quad (1)$$

$$\left( \frac{\mu^2 - D^2}{C^2} \right) = 2 \int \frac{\partial R}{\partial \tau} dt.$$

Ces équations seront singulières pour

$$\int \frac{\partial R}{\partial \tau} dt = \infty$$

et pour  $\mathcal{C} = 0$ . Mais ces deux singularités permettent d'obtenir immédiatement les résultats classiques suivants:

$$1^{\circ} \quad \int \frac{\partial R}{\partial t} \cdot \frac{\partial t}{\partial \tau} dt = \infty.$$

La fonction perturbatrice développée en une série de FOURIER

$$R = \Sigma K \cos D = \Sigma F(a, a', e, e', i, i') \times \cos \{ (nt + \varepsilon)j + (n't' + \varepsilon')j' + k\pi + k'\pi' + s\Omega + s'\Omega' \}$$

donne après l'intégration

$$\frac{1}{nj + n'j'} \int K \sin D \frac{\partial t}{\partial \tau} dt.$$

<sup>1</sup> J. O. FLECKENSTEIN, Exper. 8, 136 (1952).

Cette intégrale devient même pour les éléments réguliers singulière dans le cas de  $nj + n'j' = 0$ ; ce qui veut dire que le quotient des fréquences de révolution de la planète perturbante et de la planète perturbée est rationnel (théorème de LAPLACE, 1773).

2°  $\mathcal{C} = 0$ , ce qui veut dire que toutes les vitesses des aires sont égales à zéro. La deuxième équation du système (1) donne à cause de

$$\mathcal{D} = - \frac{\mu}{r} \mathbf{r}$$

la relation

$$\frac{\mu}{r} D^2 \mathbf{r} \cdot \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0 \quad \text{ou} \quad \frac{1}{r} \mathbf{r}(t) \cdot \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0.$$

Cette relation est remplie pour

a)  $\frac{1}{r} \mathbf{r}(t) = 0$ , c'est-à-dire dans le cas où toutes les  $n-1$  planètes se choquent simultanément dans le soleil (lemme de SOKOLOFF, 1926, ou de WEIERSTRASS-SUNDMAN, 1910, pour le cas spécial du problème des trois corps).

b)  $d\tau/dt = 0$ , c'est-à-dire pour  $\tau = \text{const.}$  Les temps des passages des périhélie sont constants pour un mouvement rectiligne des  $n-1$  corps, dont on sait que deux des droites déterminent dans le cas des trois corps un plan fixe ou coïncident en une même droite (lemme de DZIOBEK, 1888). Pour la régularisation des équations différentielles dans les cas des chocs binaires des trois corps il suffit d'abord de supposer comme SUNDMAN  $\mathcal{C} \neq 0$ ; le cas  $\mathcal{C} = 0$  représente le choc ternaire ou la coplanarité des trois corps.

J. O. FLECKENSTEIN

Institut d'Astronomie et de Météorologie, Bâle-Binningen, le 18 mars 1953.

### Zusammenfassung

Die vektorielle Darstellung der Differentialgleichungen des  $n$ -Körper-Problems nach MILANKOWITCH erlaubt, auch die Ausnahmefälle des Laplaceschen Theorems und die Singularitäten beim  $n$ -fachen Zusammenstoss sofort zu übersehen.



Die Konfiguration des Digoxigenins<sup>1</sup>

Digoxigenin ist ein herzwirksames Aglykon der Formel  $C_{23}H_{34}O_6$ , das, mit Zuckern gepaart, einen wichtigen und charakteristischen Inhaltsstoff der *Digitalis lanata* Erh. darstellt<sup>2</sup>. TSCHESCHE und BOHLE<sup>3</sup> erbrachten den Beweis, dass Digoxigenin dasselbe Kohlenstoffgerüst wie Digitoxigenin besitzt, und gaben als vermutliche Formel diejenige eines 3,11,14-Trioxo-Cardenolids an. Abbau von Digoxigenin lieferte einen Dioxy-Ätiansäuremethylester, der sich zu einem Diketo-Ätiansäuremethylester oxydieren liess. Es konnte gezeigt werden, dass dieser die 2 Ketogruppen nicht in 3,11-Stellung trug<sup>4</sup>. MASON und HOEHN<sup>5</sup> haben aus Desoxycholsäure den 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dioxy-Ätiansäuremethylester und 3,12-Diketo-Ätiansäuremethylester bereit; letzterer war identisch mit dem Diketoester aus Digoxigenin<sup>6</sup>, womit bewiesen war, dass sich die zwei sekundären HO-Gruppen in letzterem in 3- und 12-Stellung befinden. Hingegen war der aus Digoxigenin erhaltene 3,12-Dioxy-Ätiansäuremethylester nicht mit dem 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dioxyester von MASON und HOEHN identisch<sup>6</sup>, es musste demnach Raumisomerie an C-3, C-12 oder an beiden Zentren vorliegen. Über die Teilsynthese eines raumisomeren Esters, der möglicherweise mit dem Ester aus Digoxigenin identisch war und dem die 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Konfiguration zugeschrieben wurde, haben MASON und HOEHN<sup>7</sup> berichtet. Der für die Synthese benutzte Weg war aber konfigurativ nicht eindeutig.

<sup>1</sup> Auszug aus der Dissertation S. PATAKI, Basel, die demnächst erscheint.  
<sup>2</sup> S. SMITH, J. Chem. Soc. 1930, 2478. – A. STOLL und W. KREIS, Helv. chim. Acta 16, 1049 (1933). – C. MANNICH, P. MOHS und W. MAUS, Arch. Pharm. 268, 453 (1930).  
<sup>3</sup> R. TSCHESCHE und K. BOHLE, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 793 (1936).  
<sup>4</sup> M. STEIGER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 21, 828 (1938).  
<sup>5</sup> W. M. HOEHN und H. L. MASON, J. Amer. Chem. Soc. 60, 1493 (1938). – H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 60, 2566 (1938); 60, 2824 (1938).  
<sup>6</sup> H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 60, 2824 (1938).  
<sup>7</sup> H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 61, 1614 (1939).

Teilsynthetisch bereiteter 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Dioxy-Ätiansäuremethylester<sup>1</sup> von gesicherter Konfiguration zeigte äusserst ähnliche Eigenschaften wie der Dioxyester aus Digoxigenin, so dass trotz geringer Diskrepanzen (besonders bei den spezifischen Drehungen) auf Identität geschlossen wurde. Dieser Schluss erwies sich als falsch. Er stützte sich auf ungenügende Kontrolle (teilweise aus Materialmangel). Damals wurde auch noch bei den meisten anderen digitaloiden Aglykonen eine 3 $\alpha$ -ständige Oxygruppe angenommen, so dass die vermutliche 3 $\alpha$ -Stellung nicht besonders auffiel. Inzwischen wurde aber gezeigt, dass Digitoxigenin<sup>2</sup> und alle anderen bekannten digitaloiden Aglykone, soweit sicher aufgeklärt, eine 3 $\beta$ -Oxygruppe tragen<sup>3</sup>. Dieser Umstand und die genannten Diskrepanzen in den Drehungswerten liessen bereits seit längerer Zeit vermuten, dass die vermeintliche 3 $\alpha$ -Stellung in Digoxigenin unrichtig sein muss. Eine Publikation wurde aber bis zur exakten Abklärung hinausgeschoben.

Wir haben jetzt die bisher noch fehlenden 2 isomeren 3,12-Dioxy-Ätiansäuremethylester, nämlich den 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ - und 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Ester auf eindeutigen Wegen teilsynthetisch bereit, so dass nun alle vier theoretisch möglichen Isomere zum Vergleich verfügbar sind. Auch die Diazetate aller vier Ester konnten kristallisiert erhalten werden. Wie sich aus der folgenden Tabelle ergibt, ist der Dioxyester aus Digoxigenin dem 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Ester sehr ähnlich, aber eindeutig von ihm verschieden; er ist jedoch identisch mit dem 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Derivat (II), was sich besonders beim Vergleich der beiden Diazetate ergibt. Digoxigenin besitzt somit Formel (I). – Zu einem gleichen Ergebnis kamen nach Privatmitteilungen teilweise auf anderen

<sup>1</sup> V. WENNER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 27, 965 (1944), dort auf Grund der alten Nomenklatur noch als 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Ester bezeichnet.  
<sup>2</sup> F. HUNZIKER und T. REICHSTEIN, Exper. 1, 90 (1945); Helv. chim. Acta 28, 1472 (1945).  
<sup>3</sup> R. TSCHESCHE und K. H. BRATHGE, Ber. dtsch. chem. Ges. 85, 1042 (1952), haben kürzlich auf Grund ihrer vorläufigen Abbauprobe am Urezigenin angenommen, dass dieses sich von Uzarigenin nur durch die sterischen Verhältnisse an C-3 unterscheidet; damit käme Urezigenin die 3 $\alpha$ -Konfiguration zu.

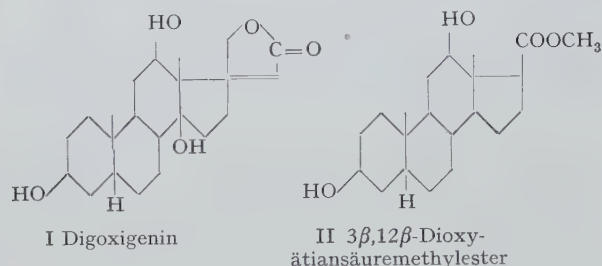
Ätiansäuremethylester synthetisch	Smp. (Kofler-Block, kor.)	$[\alpha]_D$
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dioxy- <sup>1</sup> . . . . .	144 –145°	+ 106,5° $\pm$ 3° (Methanol)
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diazetoxy- <sup>2</sup> . . . . .	152 –153°	+ 148,3° $\pm$ 2° (Chloroform)
3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Dioxy- <sup>3</sup> . . . . .	180 –182°	+ 51,7° $\pm$ 2° (Methanol)
3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Diazetoxy- . . . . .	119,5–122°	+ 84,3° $\pm$ 2° (Chloroform)
3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -Dioxy- . . . . .	158,5–160°	+ 87,6° $\pm$ 2° (Methanol)
3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -Diazetoxy- . . . . .	142 –147°	+ 110,9° $\pm$ 2° (Chloroform)
3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Dioxy- . . . . .	186,5–188,5°	+ 38,6° $\pm$ 2° (Methanol)
3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Diazetoxy- . . . . .	142 –143,5°	+ 50,7° $\pm$ 1,5° (Chloroform)
Ätiansäuremethylester aus Digoxigenin		
Dioxyester <sup>4</sup> . . . . .	180 –183°	+ 38,9° $\pm$ 3° (Methanol)
Diazetoxyester <sup>5</sup> . . . . .	142 –144°	+ 50,8° $\pm$ 2° (Chloroform)

<sup>1</sup> H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 60, 2824 (1938). – B. KOECHLIN und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 25, 918 (1942).  
<sup>2</sup> H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 60, 2824 (1938). – V. WENNER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 27, 965 (1944), nach alter Nomenklatur noch als 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Ester bezeichnet.  
<sup>3</sup> V. WENNER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 27, 965 (1944), nach alter Nomenklatur noch als 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Ester bezeichnet.  
<sup>4</sup> M. STEIGER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 21, 828 (1938). – H. L. MASON und W. M. HOEHN, J. Amer. Chem. Soc. 61, 1614 (1939).  
<sup>5</sup> Herr Dr. D. A. H. TAYLOR hat Digoxigenin ebenfalls erneut abgebaut und uns eine Probe des daraus gewonnenen 3,12-Diazetoxy-Ätiansäuremethylesters zum Vergleich gesandt. Es erwies sich nach Mischproben ebenfalls identisch mit dem synthetischen 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Derivat.



Wegen die Herren Dr. H. M. E. CARDWELL (Oxford), Dr. SYDNEY SMITH (Dartford) und Dr. D. A. H. TAYLOR, National Institute for Medical Research in London<sup>1</sup>.

Die ausführliche Arbeit wird demnächst in der «*Helvetica chimica Acta*» publiziert.



Ausser Urezigenin<sup>2</sup> enthalten daher sämtliche bis heute konfigurativ aufgeklärten digitaloiden Aglykone eine 3 $\beta$ -Oxygruppe. Dasselbe gilt übrigens auch für die Sapogenine.

Herrn Prof. A. STOLL danken wir bestens für die Überlassung einer grösseren Menge Cedilanid.

S. PATAKI, K. MEYER  
und T. REICHSTEIN

*Pharmazeutische und Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel, den 21. Mai 1953.*

#### Summary

The missing members of the four stereoisomeric 3,12-dihydroxyetianic acid methyl esters and their diacetates were synthesized. The ester obtained by degradation of digoxigenin was identical with the 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -derivative.

<sup>1</sup> Herr Dr. D. A. H. TAYLOR hat Digoxigenin ebenfalls erneut abgebaut und uns eine Probe des daraus gewonnenen 3,12-Diazetoxy-Ätiensäuremethylesters zum Vergleich gesandt. Es erwies sich nach Mischproben ebenfalls identisch mit dem synthetischen 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -Derivat.

<sup>2</sup> R. TSCHESCHE und K. H. BRATHGE, Ber. dtsch. Chem. Ges. 85, 1042 (1952), haben kürzlich auf Grund ihrer vorläufigen Abbaugesuche am Urezigenin angenommen, dass dieses sich von Uzarigenin nur durch die sterischen Verhältnisse an C-3 unterscheidet; damit käme Urezigenin die 3 $\alpha$ -Konfiguration zu.

#### DISPUTANDUM

#### The Constitution of Ajmaline

Ajmaline, C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, m.p. 159–160°, the major alkaloid of *Rauwolfia serpentina* Benth, was first isolated from its roots by S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI<sup>1</sup> and almost simultaneously by VAN ITALLIE and STEENHAUER<sup>2</sup> from the same raw materials. These investiga-

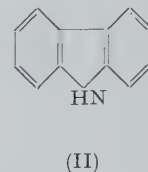
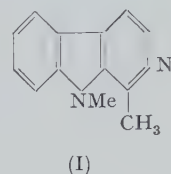
tors<sup>3</sup> suggested the formula NMeR(NH)COO for the base. The chemistry of ajmaline has recently been studied by MUKHERJI, ROBINSON, and SCHLITTLER<sup>3</sup>. They have confirmed the above composition for the alkaloid and have shown that ajmaline is a monoacidic di-tertiary base, contains an isolated double bond and shows

<sup>1</sup> S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, J. Ind. Chem. Soc. 8, 667 (1931); 9, 539 (1932); 12, 37 (1935).

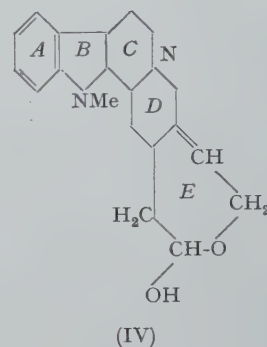
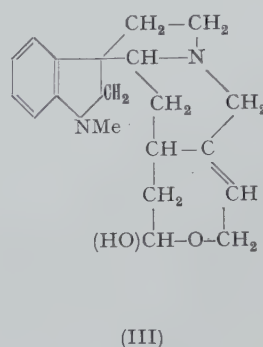
<sup>2</sup> L. VAN ITALLIE and A. J. STEENHAUER, Arch. Pharm. 270, 311 (1932).

<sup>3</sup> S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, J. Ind. Chem. Soc. 8, 667 (1931); 9, 539 (1932); 12, 37 (1935). – L. VAN ITALLIE and A. J. STEENHAUER, Arch. Pharm. 270, 311 (1932).

strychnidine-like reactions. A semi-acetal group has been found to be present in the alkaloid although the infrared spectrum of the base as reported by them shows the absence of carbonyl frequencies. On distillation over soda lime and zinc dust ajmaline has been found to yield Ind-N-methyl harman (I) C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, m.p. 102°, and carbazole (II) C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N, m.p. 236°, as the major scission products.



On the basis of these results the following two hypothetical structures (III) and (IV) have been postulated by ROBINSON and his collaborators<sup>1</sup>.



They are, however, of opinion that it would be reasonable to accept the structure (III) and not (IV) as the latter represents a dihydroindole derivative which as such has not yet been found to occur in nature.

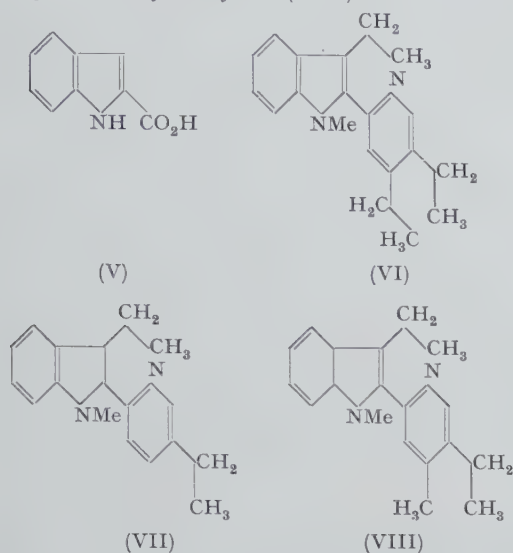
The infrared spectrum of ajmaline studied<sup>3</sup> by the present authors shows an absorption band at 5.82  $\mu$  indicating about 15–20% carbonyl absorption which definitely shows that ajmaline contains a carbonyl group. The presence of a cyclic acetal group (–CHOH–O–) group in ajmaline suggested by ROBINSON and his collaborators<sup>1</sup> has been confirmed from the spectrographic data. From the spectral data several other important informations have also been obtained. The spectrum shows an absorption band for >CMe group at 7.24  $\mu$ , for ether bridge at 9  $\mu$  and that for dihydroindole at 6.2–6.8  $\mu$  and for hydroxyl at 3.02  $\mu$  in ajmaline.

It has also been observed in the present investigation that on fusion with potassium hydroxide ajmaline produces a crystalline base and two different acids, one of which has been proved to be identical with indole-2-carboxylic-acid (V) C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, m.p. 199°. (Found: C, 67.06; H, 4.34; N, 8.72. Calcd. for C, 67.09; H, 4.35; N, 8.70%). The second acid has been found to be free from nitrogen; the characterisation of this non-nitrogenous acid and the base is in progress. Formation of indole-2-carboxylic-acid (V) from ajmaline shows that  $\alpha$ -position of the dihydroindole nucleus (B) in the base is substituted by a methyl or a methylene group. These observations do not seem to support the blocked hydroindole structure (III) for ajmaline postulated by ROBINSON *et al.*<sup>1</sup>. The structure (IV), however, can explain

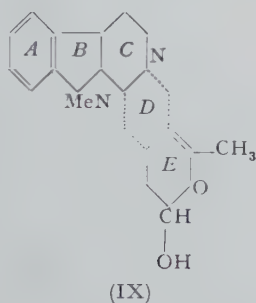
<sup>1</sup> D. MUKHERJI (Miss), R. ROBINSON, and E. SCHLITTLER, Exper. 5, 215 (1949).



the formation of indole-2-acid from ajmaline by its degradation with alkali. But according to structure (IV), the base should produce on selenium dehydrogenation Ind-N-methyl derivatives of alstyrine, viz., N-methyl alstyrine (VI), desethyl-N-methyl alstyrine (VII) or desmethyl-N-methyl alstyrine (VIII).



Ajmaline on dehydrogenation with selenium at 300° has been found to produce none of these products but only Ind-N-methyl harman (I),  $C_{13}H_{12}N_2$ , m.p. 102° (Found: C, 79.8; H, 5.99; N, 14.31. Calcd. for C, 79.6; H, 6.12; N, 14.28%) and a few uncharacterized indole derivatives as nonbasic fragments. During alkali fusion and dehydrogenation of the base with selenium the formation of carbazole could not be established. Ind-N-methyl harman, however, seems to be the common degradation product of the alkaloid obtained during its



distillation over soda lime, zinc dust<sup>1</sup> as also during its dehydrogenation with selenium. It is therefore suggested that ajmaline contains the fused ring system A, B, and C as shown in structure (IX). The ring D appears to be involved in a weak linkage as a result of which Ind-N-methyl harman is readily produced from the base during its degradations and not the Ind-N-methyl alstyrine derivatives. (IX) represents a dihydroindole derivative. Such derivatives have been found to occur in Nature, viz., the erythrina alkaloids<sup>2</sup> (*Fam. Leguminosae*). ROBINSON *et al.*<sup>3</sup> and SCHÖPF<sup>4</sup> and his collabo-

<sup>1</sup> D. MUKHERJI (Miss), R. ROBINSON, and E. SCHLITTLER, *Exper.* **5**, 215 (1949).

<sup>2</sup> K. FOLKERS, F. KONIUSZY, and J. SHAVER, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 2146 (1942).

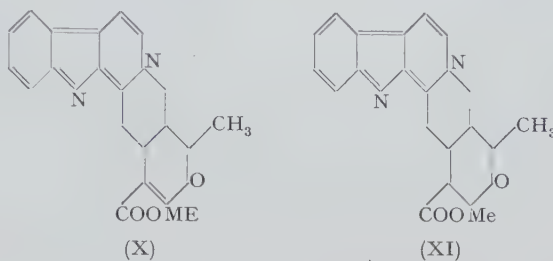
<sup>3</sup> R. ROBINSON and S. SUGASAWA, *J. chem. Soc.* **789** (1932); R. ROBINSON, *ibid.*, 1079 (1936).

<sup>4</sup> C. SCHÖPF and K. THIERFELDER, *Lieb. Ann. Chem.* **497**, 22 (1932).

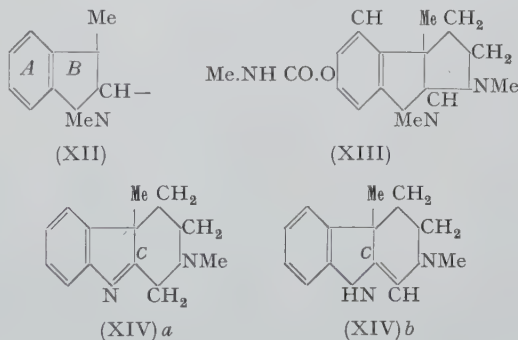
rators have also suggested that the biogenesis of such dihydroindole alkaloids is possible in Nature.

The probable location of the  $\text{>CMe}$  group, the characteristic band of which appears in its I.R. spectrum at  $7.24 \mu$  and the presence of which has been established by KUHN-ROTH method (found  $\text{>CMe}$ , 4.47. Calculated for one  $\text{>CMe}$ , 4.60 %) seems to be in ring E as shown in (IX).

In such a case E would be a six-membered heterocyclic ring-like that of alstonine<sup>1</sup> (X) or serpentine<sup>2</sup> (XI) and not seven-membered (IV) as advocated by ROBINSON and his collaborators.



There might be, however, another possibility that the  $\text{>CMe}$  group in the alkaloid might be in ring B as shown in (XII) like that of physostigmine<sup>3</sup> (XIII) or calycanthidine<sup>4</sup> (XIV) a or (XIV) b.



But from the simultaneous occurrence of ajmaline with alstonine in *Rauwolfia vomitoria* and *R. obscura*<sup>5</sup> (*Fam. Apocynaceae*) and with serpentine in *R. serpentina*<sup>6</sup> it seems probable that the  $\text{>CMe}$  group in ajmaline would be in ring E (IX).

A. CHATTERJEE and S. BOSE

Department of Pure Chemistry, University College of Science and Technology, Calcutta, India, February 3, 1953.

#### Zusammenfassung

Das IR.-Absorptionsspektrum des Alkaloids Ajmalin zeigt die typische  $\text{>CMe}$ -Bande ( $7.24 \mu$ ) in der Seitenkette (festgestellt mit KUHN-ROTH); bei  $5.92 \mu$  er-

<sup>1</sup> R. C. ELDERFIELD and A. P. GRAY, *J. Org. Chem.* **16**, 506 (1951).  
– E. SCHLITTLER, H. SCHWARZ, and F. BADER, *Helv. chim. Acta* **35**, 271 (1952).

<sup>2</sup> F. BADER und H. SCHWARZ, *Helv. chim. Acta* **35**, 1594 (1952).

<sup>3</sup> R. ROBINSON and H. SUGINOME, *J. chem. Soc.* **1932**, 298, 304.

<sup>4</sup> P. R. LEVY and R. ROBINSON, *Festschrift Karrer* (April, 1949), p. 40.

<sup>5</sup> E. SCHLITTLER, H. SCHWARZ, and F. BADER, *Helv. chim. Acta* **35**, 271 (1952).

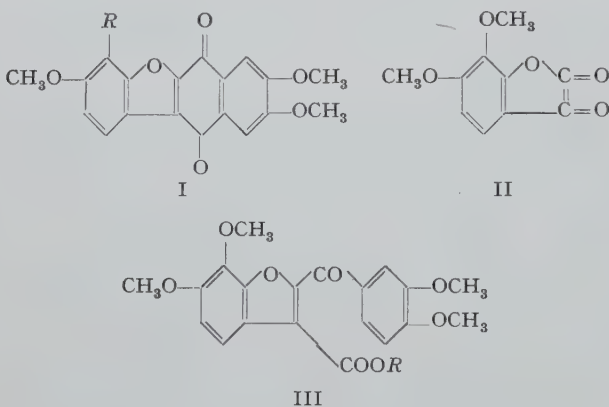
<sup>6</sup> E. SCHLITTLER und H. SCHWARZ, *Helv. chim. Acta*, **33**, 1463 (1950).



scheint die Bande der Karbonylgruppe. Ajmalin wurde durch Abbau mit Selen in Ind-N-methyl-harman übergeführt. Durch Kalischmelze lässt sich Ajmalin in eine kristalline Base (in kleiner Menge), eine stickstofffreie Säure und Indol-2-Karbonsäure aufspalten. Auf Grund dieser Spaltstücke wurde eine mögliche Strukturformel für Ajmalin diskutiert.

### Synthesis of 3:8:9-Trimethoxy- and 3:4:8:9-Tetramethoxy- $\beta$ -Brazanquinone

KOSTANECKI and his coworkers prepared 3:8:9-trimethoxy- $\beta$ -brazanquinone (I,  $R = H$ , m.p.  $260^{\circ}C$ )<sup>1</sup> and 3:4:8:9-tetramethoxy- $\beta$ -brazanquinone (I,  $R = OCH_3$ , m.p.  $264^{\circ}C$ )<sup>2</sup> by the oxidation of 3:8:9-trimethoxy-6-hydroxy- and 3:4:8:9-tetramethoxy-6-hydroxy- $\beta$ -brazan respectively with chromic acid. In an earlier communication, a synthesis of (I,  $R = H$ ) was described<sup>3</sup>. An independent method of synthesis of the two above-mentioned quinones is now reported.



6:7-dimethoxycoumaranone<sup>4</sup> was converted into 6:7-dimethoxy-2-oximinocoumaranone (m.p.  $194^{\circ}$ ) and then hydrolyzed to 2-hydroxy-3:4-dimethoxyphenylglyoxalic acid (m.p.  $178^{\circ}C$ ; methyl ester, m.p.  $99-100^{\circ}C$ ). The latter on treatment with acetic anhydride gave 6:7-dimethoxycoumarandione (II, m.p.  $153^{\circ}C$ ). On interaction with  $\omega$ -bromoacetoveratrone in presence of sodium ethoxide this afforded ethyl 6:7-dimethoxy-2-veratroylcoumarone-3-carboxylate (III,  $R = C_2H_5$ , m.p.  $99-101^{\circ}C$ ). The corresponding acid (III,  $R = H$ , m.p.  $205^{\circ}C$ ) on cyclisation through the acid chloride furnished (I,  $R = OCH_3$ , m.p.  $265^{\circ}C$ ) purified by sublimation in vacuum. The identity was confirmed by colour reaction and by reductive acetylation to 3:4:8:9-tetramethoxy-6:11-diacetoxy- $\beta$ -brazan (m.p.  $235^{\circ}C$ )<sup>2</sup>.

Analogously, 6-methoxycoumarandione<sup>5</sup> was converted into ethyl 6-methoxy-2-veratroylcoumarone-3-carboxylate (m.p.  $127-128^{\circ}C$ ). The related acid (m.p.  $208^{\circ}C$ ) on cyclisation gave (I,  $R = H$ , m.p.  $262^{\circ}C$ ) identical with the specimen synthesized earlier.

J. N. CHATTERJEA

Chemical Laboratory, Science College, Patna, India, February 19, 1953.

<sup>1</sup> V. KOSTANECKI and L. LLOYD, Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 2200 (1903).

<sup>2</sup> V. KOSTANECKI and A. ROST, Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 2205 (1903).

<sup>3</sup> J. N. CHATTERJEA, Exper. **7**, 374 (1951).

<sup>4</sup> A. FELIX and P. FRIEDLANDER, Mh. Chem. **31**, 55 (1910).

<sup>5</sup> K. FRIES and K. SAFTIEN, Ann. Chem. **442**, 291 (1925).

### Résumé

Cet article décrit une méthode sans ambiguïté pour la synthèse des 3:4:8:9-tétraméthoxy- et 3:8:9-triméthoxy- $\beta$ -brazanquinone.

### The Stereochemistry of the Reaction of Nitrous Acid with Cyclohexylamines

BARTON and ROSENFELDER<sup>1</sup> have observed that ionic elimination reactions involving substituents on adjacent carbon atoms in a cyclohexane derivative proceed most readily when the two substituents form polar bonds (that is the two carbon atoms and the two substituents involved are in one plane). They have also pointed out that the formation of olefines by the action of nitrous acid on primary amines shows the same geometric specificity and cited menthylamines as examples.

We have found that, on the basis of the concept of polar and equatorial bonds, the behaviour of cyclohexylamines with nitrous acid can be correlated as follows:

When the amino group forms an equatorial bond the main reaction product is the corresponding alcohol with the hydroxy group equatorial (that is no WALDEN inversion takes place).

When the amino group is linked by a polar bond, considerable amounts of cyclohexenes are formed along with a mixture of both epimeric forms of the alcohol (that is WALDEN inversion occurs).

We have tested these rules for a number of cyclohexylamines (Table I, II). The conformation of cyclohexylamines and cyclohexanols was determined in most cases on the basis of the observation that sodium and alcohol reduction of a ketone or an oxime leads predominantly to the thermodynamically more stable epimer of the corresponding alcohol or amine<sup>2</sup>. Cyclohexanols and cyclohexylamines produced by such reduction should therefore in general have their hydroxy and amino groups equatorially bonded, while catalytic reduction in presence of platinum in acid media should mainly afford epimers in which the hydroxy and the amino groups will be polar linked.

HÜCKEL and coworkers<sup>3</sup> have carried out epimerization experiments with decalols. On the basis of their work the equatorial position can be assigned to the hydroxy and the amino groups in the following compounds: trans- $\alpha$ -decalol, m.p.  $63^{\circ}$ , trans- $\alpha$ -decalylamine, m.p.  $-1^{\circ}$ , trans- $\beta$ -decalol, m.p.  $75^{\circ}$ , trans- $\beta$ -decalylamine, m.p.  $15^{\circ}$ .

The data presented in tables I and II testify to the validity of the rules postulated by us. As the result of their studies on the action of nitrous acid on decalylamines HÜCKEL and coworkers found that those trans-decalylamines that are obtained by the sodium and alcohol reduction of oximes react with nitrous acid to afford decalols that are predominantly produced by the sodium and alcohol reduction of decalones<sup>3</sup>. It should be noted that this rule is the same as the rule described above in terms of polar and equatorial bonds.

<sup>1</sup> D. H. R. BARTON and W. J. ROSENFELDER, J. Chem. Soc. **1951**, 1048.

<sup>2</sup> G. VAVON, Bull. Soc. chim. **49**, 937 (1931). – W. HÜCKEL, Ann. Chem. **533**, 1 (1938).

<sup>3</sup> W. HÜCKEL, Ann. Chem. **533**, 1 (1938).



Table I

Cyclohexylamine (NH <sub>2</sub> equatorial)	Composition of product		Cyclohexanol produced (OH equatorial)	Ref.
	Cyclohexene	Cyclohexanol		
"trans"-3-Methylcyclohexylamine <sup>1,2</sup> . . .			cis-3-Methylcyclohexanol <sup>6</sup>	2
trans-4-Methylcyclohexylamine <sup>2</sup> . . . . .			trans-4-Methylcyclohexanol <sup>2</sup> 60% yield	3
trans-4-Phenylcyclohexylamine <sup>3</sup> . . . . .			trans-4-Phenylcyclohexanol <sup>3</sup> 53% yield	3
trans-4-Cyclohexylcyclohexylamine <sup>3</sup> . . .			trans-4-Cyclohexylcyclohexanol	
			49% yield	3
trans-4-t-Butylcyclohexylamine <sup>3</sup> . . . . .			trans-4-t-Butylcyclohexanol <sup>3</sup> 55% yield	3
Menthylamine . . . . .	Little	Mostly	Menthol <sup>7</sup>	8
iso-Menthylamine . . . . .	Little	Mostly	iso-Menthol <sup>7</sup>	8
Carvomenthylamine <sup>4</sup> . . . . .	15%	85%	Carvomenthol <sup>4</sup>	9
trans- $\alpha$ -Decalylamine <sup>5</sup> , m.p. -1° . . . . .	nil	100%	trans- $\alpha$ -Decalol <sup>5</sup> , m.p. 63°	5
trans- $\beta$ -Decalylamine <sup>5</sup> , m.p. 15° . . . . .	nil	100%	trans- $\beta$ -Decalol <sup>5</sup> , m.p. 75°	5

<sup>1</sup> Conformational analysis indicates that "trans"-1,3-methylcyclohexylamine should actually be termed cis.

<sup>2</sup> M. M. CLAUDON, Bull. Soc. chim. France, 1950, 627.

<sup>3</sup> D. V. NIGHTINGALE, J. D. KERR, J. A. GALLAGHER, and M. MAIENTHAL, J. Org. Chem. 17, 1017 (1952).

<sup>4</sup> A. K. BOSE, Exper. 8, 458 (1952).

<sup>5</sup> W. HÜCKEL, Ann. Chem. 533, 1 (1938).

<sup>6</sup> D. S. NOYCE and D. B. DENNEY, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5912 (1952). – H. L. GOERING and C. SERRES, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5908 (1952).

<sup>7</sup> D. H. R. BARTON, Exper. 6, 316 (1950).

<sup>8</sup> J. READ, A. M. COOK, and M. I. SHANNON, J. Chem. Soc. 1926, 2223.

<sup>9</sup> R. G. JOHNSTON and J. READ, J. Chem. Soc. 1935, 1138.

Table II

Cyclohexylamine (NH <sub>2</sub> polar)	Composition of product		Cyclohexanol produced	Ref.
	Cyclohexene	Cyclohexanol		
"cis"-3-Methylcyclohexylamine <sup>1</sup> . . . . .			45% WALDEN inversion	2
cis-4-Methylcyclohexylamine <sup>5</sup> . . . . .			25% WALDEN inversion	2
neo-Menthylamine . . . . .	81%	19%	Mixture of epimers	6
neo-iso-Menthylamine. . . . .	80%	20%	Mixture of epimers	6
neo-Carvomethylamine <sup>3</sup> . . . . .	80%	20%	60% WALDEN inversion	3
trans- $\alpha$ -Decalylamine <sup>4</sup> , m.p. -18° . . . . .	70%	30%	90% WALDEN inversion	4
trans- $\beta$ -Decalylamine <sup>4</sup> , m.p. -47° . . . . .	70%	30%	90% WALDEN inversion	4

<sup>1</sup> Conformational analysis indicates that "Cis"-1,3-methylcyclohexylamine should actually be termed trans.

<sup>2</sup> M. M. CLAUDON, Bull. Soc. chim. France, 1950, 627.

<sup>3</sup> A. K. BOSE, Exper. 8, 458 (1952).

<sup>4</sup> W. HÜCKEL, Ann. Chem. 533, 1 (1938).

<sup>5</sup> D. V. NIGHTINGALE, J. D. KERR, J. A. GALLAGHER, and M. MAIENTHAL, J. Org. Chem. 17, 1017 (1952).

<sup>6</sup> J. READ and G. J. ROBERTSON, J. Chem. Soc. 1927, 2168.

<sup>7</sup> R. G. JOHNSTON and J. READ, J. Chem. Soc. 1935, 1138.

The reaction of nitrous acid with cyclohexylamines possesses diagnostic value and promises to be useful for conformation determination<sup>1</sup>.

A. K. BOSE

Applied Chemistry Department, Indian Institute of Technology, Kharagpur, India, December 30, 1952.

Zusammenfassung

Wenn die Aminogruppe in Zyklohexylaminen durch eine äquatoriale Bindung verknüpft ist, ist das Hauptprodukt bei der Reaktion mit salpetriger Säure das entsprechende Zyklohexanol mit einer äquatorialen Hydroxylgruppe (das heisst, die Waldensche Umkehrung findet nicht statt). Wenn die Aminogruppe durch eine polare Bindung verknüpft ist, werden beträchtliche Mengen von Zyklohexenen, begleitet von einer Mischung beider epimeren Formen des entsprechenden Zyklohexanols, gebildet (das heisst, die Waldensche Umkehrung findet statt).

<sup>1</sup> A. K. BOSE, Exper. 8, 458 (1952).

The Enzymatic Hydrolysis of Glutathione by *Vibrio Cholerae*

The pathway of metabolism of glutathione, which is normally considered to be comparatively stable towards enzymes because of the  $\gamma$ -linkage in it, is fairly well known in animals. Thus GRASSMANN, DYCKERHOFF, and EIBELER<sup>1</sup> showed that oxidized glutathione was hydrolyzed into glycine and di-glutamyl cystine by pancreas. Later SCHROEDER, MUNRO, and WEIL<sup>2</sup> and SCHROEDER and WOODWARD<sup>3</sup> reported the complete breakdown of reduced glutathione into its constituent amino acids by the enzymes present in the rat kidney. The work of DYER and DU VIGNEAUD<sup>4</sup> on the replacement of cystine

<sup>1</sup> W. GRASSMANN, H. DYCKERHOFF, and H. EIBELER, Z. physiol. Chem. 189, 112 (1930).

<sup>2</sup> E. F. SCHROEDER, M. P. MUNRO, and L. WEIL, J. Biol. Chem. 110, 181 (1935).

<sup>3</sup> E. F. SCHROEDER and G. E. WOODWARD, J. Biol. Chem. 120, 209 (1937).

<sup>4</sup> H. M. DYER and V. DU VIGNEAUD, J. Biol. Chem. 115, 543 (1936).

by glutathione in rats held on cystine deficient diet further indicated the hydrolysis of glutathione to yield cystine or cysteine during metabolism. Besides hydrolysis, transpeptidase reactions involving glutathione and other  $\gamma$ -glutamyl peptides have been reported by HANES and coworkers<sup>1</sup> and FODER *et al.*<sup>2</sup>

Very little information is, however, available about the metabolism of glutathione in bacteria. So far the only role assigned to glutathione has been that of a coenzyme for glyoxylase<sup>3</sup>. GOULD<sup>4</sup> found that glutathione was essential for certain strains of gonococci after they have been cultured in the laboratory for a few weeks. In our studies on the absorption and excretion of amino acids by *Vibrio cholerae*, hydrolysis of added glutathione has been noted during growth of this organism and the observations so far made, have been reported in the present communication.

### Experimental

**Cholera cultures.**—Ogawa 52 and Inaba 52 were used in these studies. The parent Ogawa strain was obtained from the Central Research Institute, Kasauli, and it was converted to the corresponding Inaba subtype<sup>5</sup>.

**Growth medium.**—The following two media at pH 8.0 were used: (1) The glucose-salt medium reported earlier<sup>6</sup>. (2) The peptone medium consisting of 0.5% oxoid peptone and 0.5% sodium chloride.

15 ml of the medium were measured out in 50 ml. ERLLENMEYER flasks and sterilized at 15 lbs. for 15 min. 18 h growth of *Vibrio cholerae* on papain-meat-agar slants was harvested and washed twice with saline (0.85%) and the suspension finally adjusted to a turbidity of 30% transmission, in a Lumetron Photoelectric Colorimeter (650 m $\mu$  red filter). Flasks containing the media with and without glutathione (0.03%) were inoculated with two drops of the standard bacterial suspension, incubated at 37°C for 24 and 48 h, respectively, for the peptone and glucose-salt media, and centrifuged. The cell free supernatants were used for running two phase ascending chromatograms. Uninoculated media incubated for similar periods were taken as controls.

**Chromatography.**—The technique of ascending chromatography, using Whatman No. 1 filter paper (size 11  $\frac{1}{4}$ " square) was adopted throughout. The chromatograms folded in the form of cylinders were kept in Pyrex glass jars of 8" diameter and 12" height. The solvent was kept in a petri-dish at the bottom and the jars were covered by a ground glass plate and sealed with vaseline. All experiments were conducted at room temperature (24 to 26°C). The first solvent was prepared as follows: Phenol (B.D.H.) was distilled and saturated with a salt solution containing 6.3 g sodium citrate (ANALAR) and 3.7 g of sodium or potassium dihydrogen phosphate in 100 ml of water<sup>7</sup>. The second solvent was n-butanol (E. MERCK), glacial acetic acid (B.D.H.) and water in the ratio of 4:1:1. The chromatograms were irrigated for about 12 to 16 h and after drying, the colour

was developed by spraying with 0.1% ninhydrin in n-butyl alcohol.

### Results

Since the results obtained with both Ogawa 52 and Inaba 52 were similar, only those with the former subtype are being reported.

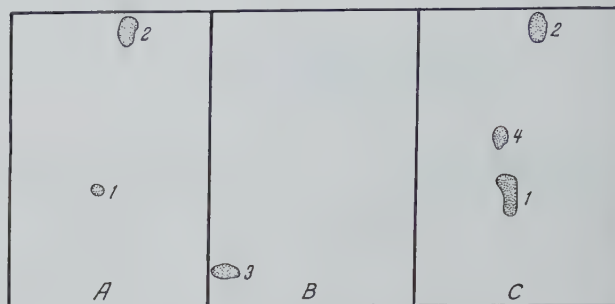


Fig. 1.—The hydrolysis of glutathione by *Vibrio cholerae* in glucose-salt medium. 1 Glutamic acid, 2 Alanine, 3 Glutathione, 4 Glycine.—A Supernatant after growth in glucose-salt medium. B Glucose-salt medium + glutathione, control. C. Supernatant after growth in B.

**Hydrolysis of glutathione in the synthetic medium.**—With a view to see the changes produced in the medium by the growth of *Vibrio cholerae*, control experiments were first run without the addition of glutathione. The uninoculated medium by itself, did not give any spots on the chromatograms, whereas after the addition of glutathione and incubation at 37°C, one spot (Fig. 1B) corresponding to it was obtained indicating that no hydrolysis had taken place. The supernatant from the growth of cholera vibrio in glutathione-free medium, gave two spots (Fig. 1A) which were identified to be alanine and glutamic acid. When, however, the supernatant from the growth of *Vibrio cholerae* in glutathione containing medium was chromatographed, it was found (Fig. 1C) that the glutathione spot had completely disappeared and the spot of glutamic acid considerably intensified. In addition, a new spot (identified as glycine) appeared on the chromatogram. In some cases glutamic acid gave a streak-like spot, almost appearing as two spots. But by running mixed chromatograms with pure acid, it was found that the two spots represented only glutamic acid. A similar chromatogram of glutamic acid has been reported recently by POLLI and BESTETTI<sup>1</sup>.

**Hydrolysis of glutathione in peptone medium.**—Similar experiments when repeated in the peptone medium gave the same kinds of results (Fig. 2). A chromatogram of the uninoculated peptone medium itself, is given in Figure 2A. Only 8 spots appeared, out of which 3 were identified to be aspartic, glutamic and glycine. No attempt was made to identify the other amino-acids. It would be seen from Figure 2B that when 52 Ogawa was grown in the peptone broth, only the aspartic and glutamic acids were absorbed or metabolized from the medium, presumably as a result of deamination<sup>2</sup>. Addition of glutathione gave only 1 more spot in the control medium (Fig. 2C). This was completely hydrolyzed by *Vibrio cholerae* during growth (Fig. 2D). The re-appearance and intensification of the spot of glutamic acid as compared to Figures 2B and 2C respectively would indicate that the extra amount obtained from glutathione remains unmetabolised.

<sup>1</sup> E. E. POLLI and A. BESTETTI, *Exper.* 8, 345 (1952).

<sup>2</sup> A. DUDANI, S. N. IYER, C. R. KRISHNAMURTI, and D. L. SHRIVASTAVA, *Current Sci.* 21, 134 (1952).

<sup>1</sup> C. S. HANES, F. J. R. HIRD, and F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* 51, 25 (1952).

<sup>2</sup> P. J. FODER, A. MILLER, and H. WAELSCH, *Nature* 170, 841 (1952).

<sup>3</sup> K. LOHMANN, *Biochem. Z.* 254, 332 (1932).

<sup>4</sup> R. G. GOULD, *J. Biol. Chem.* 153, 143 (1943).

<sup>5</sup> D. L. SHRIVASTAVA and P. B. WHITE, *Ind. J. Med. Res.* 35, 117 (1947).

<sup>6</sup> K. C. SAXENA, K. BHASKARAN, S. C. AGARWALA, and D. L. SHRIVASTAVA, *J. Sci. Industr. Res.* 12 [B], 34 (1953).

<sup>7</sup> Biochemical Institute-Studies IV (University of Texas Publication, Texas, U.S.A., 1951), p. 25.



*Hydrolysis of glutathione in the presence of cysteine.*—Since glutathione on hydrolysis gives glutamic acid, cysteine and glycine, it was apparent from the above experiments that the cysteine liberated from the glutathione molecule was absorbed or metabolized by the

hydrolyzed by the growing cells of *Vibrio cholerae* and the cysteine moiety was taken up or metabolized (Fig. 1C). The importance of cysteine or cystine in the growth of *Vibrio cholerae* has also been indicated by VEERARAGHAVAN<sup>1</sup>. It might be argued that the hydrolysis of



Fig. 2.—The hydrolysis of glutathione by *Vibrio cholerae* in peptone broth. 1 Glutamic acid, 3 Glutathione, 4 Glycine, 5 Aspartic acid.—A Peptone broth, control. B Supernatant after growth in A. C Peptone broth + glutathione, control. D. Supernatant after growth in C.

cells of *Vibrio cholerae*, during growth. A control experiment with the addition of cysteine in the glucose-salt medium (Fig. 3A) also established the fact that cysteine in the concentration of 0.03 % was completely metabolized by the growing cells of *Vibrio cholerae*, as shown by the disappearance of the cysteine spot in chromatogram 3B. Even in the presence of added cysteine (Fig. 3C), glutathione was hydrolyzed by the *Vibrio cholerae* cells (Fig. 3D). Faint residual spot of cysteine is also seen in this chromatogram, in addition to the intense spots of glutamic acid and glycine. Alanine, of course, persists in all the chromatograms of the culture supernatants.

#### Discussion

Results reported above (Fig. 1A) in the glucose-salt medium show that growing cells of *Vibrio cholerae*, like *Bacillus anthracis*<sup>1</sup>, *Brucella abortus*<sup>2</sup>, and *Penicillium chrysogenum*<sup>3</sup> excrete alanine and glutamic acid. When glutathione, however, was added to the medium, it was

<sup>1</sup> R. D. HOUSEWRIGHT and C. B. THORNE, J. Bact. 60, 89 (1950).

<sup>2</sup> R. J. GOODLOW, W. BRAUN, and L. A. MIKA, Arch. Biochem. 30, 402 (1951).

<sup>3</sup> P. L. NARASIMHA RAO and R. VENKATARAMAN, Exper. 8, 350 (1952).

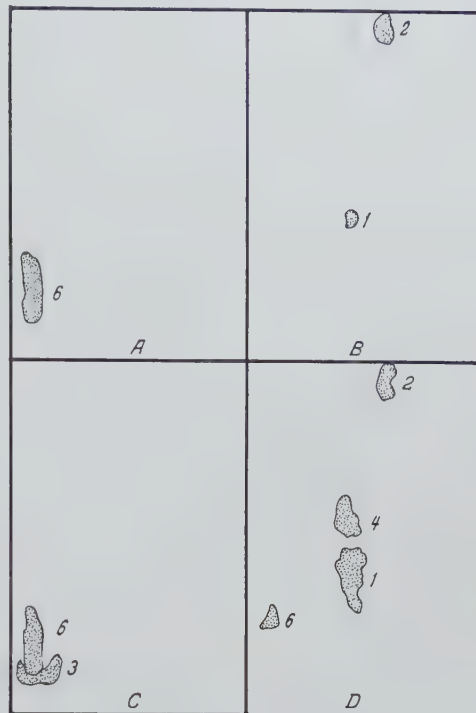


Fig. 3.—The hydrolysis of glutathione by *Vibrio cholerae* in the presence of cysteine in glucose-salt medium. 1 Glutamic acid, 2 Alanine, 3 Glutathione, 4 Glycine, 6 Cysteine.—A Control medium + cysteine. B Supernatant after growth in A. C Control medium + cysteine + glutathione. D Supernatant after growth in C.

glutathione is chiefly due to the requirement of cysteine by the growing cells, but this would not appear to be true because of a similar observation (Fig. 3D) in the synthetic medium irrespective of the presence of cysteine or cystine. This, along with the hydrolysis of glutathione observed in the peptone medium (Fig. 2D), would point to the possible presence of a  $\gamma$ -peptidase in *Vibrio cholerae* cells. As far as we know, this is the first observation of the hydrolysis and metabolism of glutathione, by any pathogenic or non-pathogenic bacteria. Further work on the factors affecting the hydrolysis and its mechanism is in progress.

S. C. AGARWALA, V. K. MOHAN RAO,  
and D. L. SHRIVASTAVA

Central Drug Research Institute, Lucknow, India,  
February 1, 1953.

#### Zusammenfassung

1. Wachsende Zellen von Choleravibrien geben an das Glukose und Salze enthaltende Medium Alanin und Glutaminsäure ab.

2. Dem Medium zugesetztes Glutathion wird von den Choleravibrien hydrolysiert. Dabei treten Glykokoll und Glutaminsäure frei auf, der Zysteinrest wird im Stoffwechsel umgesetzt.

3. Es wurde gezeigt, dass die Hydrolyse des Glutathions nicht auf dem Bedürfnis der wachsenden Zellen an Zystein beruht.

4. Es wird angenommen, dass die Zellen der Choleravibrien eine  $\gamma$ -Peptidase besitzen.

<sup>1</sup> N. VEERARAGHAVAN, Nature 163, 138 (1949).

## Alkoxytrimethylammonium Salts and Muscarine

In connection with natural product studies, we have had occasion to consider the chemical and pharmacological properties of alkoxytrimethylammonium salts.

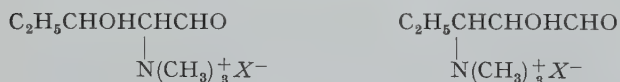
Methoxytrimethylammonium iodide, ethoxytrimethylammonium iodide, and propoxytrimethylammonium iodide have been compared in several pharmacological tests with tetramethylammonium iodide, ethyltrimethylammonium iodide, and propyltrimethylammonium iodide. The results are tabulated below. In general the *alkoxy* and *alkyl* trimethylammonium salts appear very similar in biological properties, manifesting typical cholinergic activity (Table).

Methoxytrimethylammonium iodide<sup>1</sup> causes an effect on the carotid pressure of chloralosed dogs similar to that of tetramethylammonium iodide (IV), the activity ratios between I and IV being 1:1.5 and 1:3, depending upon the experimental conditions.

As the molecular weight of compounds in the above series increases, a change in the pharmacological action is observed from a hypertension of the nicotine type to a muscarine-like hypotension. This effect takes place more rapidly and the muscarinic properties are more intense in the alkoxyquaternary derivatives. At a dose of 0.1 mg/kg i.v., propyltrimethylammonium iodide (VI) and to a somewhat greater extent propoxytrimethylammonium iodide (III) are hypotensive in the normal dog; atropine changes the blood pressure to a moderate hypertension.

Furthermore the two series had similar properties as determined by treatment of preparations of isolated intestinal strip of rabbit, of the muscle Rectus abdominis of the toad and of a neuromuscular preparation of the toad, as well as toxicity tests on mice and rabbits.

It is interesting that the alkoxytrimethylammonium salts resemble muscarine, not only in pharmacological properties, but in certain chemical properties as well. KÖGL<sup>1</sup> has suggested alternative structures for the alkaloid:



<sup>1</sup> F. KÖGL, H. DUISBERG, and H. ERXLING, *Ann. Chem.* **486**, 156 (1931).

but synthetic products with these structures, although possibly incorrect configurations, have no appreciable muscarinic activity<sup>1</sup>. It may be significant that an alkoxytrimethylammonium salt contains a potential aldehyde group. MEISENHEIMER<sup>2</sup> has shown that compounds of the structure  $\text{RCH}_2\text{ON}(\text{CH}_3)_3\text{X}$  are decomposed by alkali to trimethylamine and the corresponding aldehyde ( $\text{RCHO}$ ). This reaction resembles the degradation of muscarine by silver oxide to trimethylamine and  $\alpha,\beta$ -dihydroxyvaleric acid, as silver oxide would oxidize an intermediate aldehyde. The SCHIFF and ANGELI-RIMINI aldehyde reactions obtained with muscarine may also be explained by an alkoxy-quaternary structure.

As alkali is employed in the ANGELI-RIMINI test, alkoxyquaternaries should function as aldehydes. SCHIFF tests on methoxy and ethoxytrimethylammonium iodides are negative in the cold, but positive on heating for one minute at 80°, conditions in which a control is negative; the closely-related trimethylamineoxide hydrochloride gives a positive test at room temperature.

One observation concerning the aldehyde function of muscarine is better understood in terms of a potential than a free aldehyde group. This is the failure of attempts to reduce muscarine with hydrogen and platinum catalyst.

It appears worthwhile to examine more alkoxyquaternaries, especially amyloxy and oxygenated amyloxy compounds, assuming a relation to muscarine. The method used for the preparation of the methoxy, ethoxy and propoxytrimethylammonium iodides, reaction of trimethylamineoxide with alkyl iodide<sup>2</sup>, gives a complex mixture of products which cannot be satisfactorily separated when butyl iodide is used. Other synthetic methods will be studied.

E. F. ROGERS, D. BOVET,

V. G. LONGO, and

G. B. MARINI-BETTOLO

*Laboratory for Therapeutic Chemistry, Istituto superiore di Sanità, Rome, February 25, 1953.*

### Zusammenfassung

Es wird die azetylcholinähnliche Wirkung der Alkoxytrimethylammoniumsalze aufgezeigt und im Vergleich zur Struktur der natürlichen Muskarine diskutiert.

<sup>1</sup> F. KÖGL and H. VELDSTRA, *Ann. Chem.* **552**, 1 (1942).

<sup>2</sup> J. MEISENHEIMER, *Ann. Chem.* **397**, 273 (1913).

Substance	m.p.	Blood pressure in chloralosed dog <sup>1</sup>		Toad <sup>4</sup> Rectus abdominis	Rabbit <sup>5</sup> isolated intestine	Mouse L.D. <sub>50</sub> i.v.	Rabbit L.D. <sub>50</sub> i.v.
		Normal <sup>2</sup>	Atropinized <sup>3</sup>				
I. MeONMe <sup>3</sup> I <sup>6</sup>	161°	Hypertension (0.075–0.15)	Hypertension	20	2	25	7
II. EtONMe <sup>3</sup> I <sup>7</sup>	122°	Hypotension followed by hypertension	Hypertension	15	4	40	5
III. PrONMe <sup>3</sup> I <sup>8</sup>	125°–138°	Hypotension	Slight hypertension	2.5	2	50	3
IV. MeNMe <sup>3</sup> I	230°	Hypertension (0.05)	Hypertension	2.5	1	10	3
V. EtNMe <sup>3</sup> I	sub.	Hypertension (0.1–0.2)	Hypertension	10	1.5–2	15	5
VI. PrNMe <sup>3</sup> I	188°	Hypotension	Slight hypertension	50	20	80	7

<sup>1</sup> I.v. injection.

<sup>2</sup> The data in the brackets represent the dose in mg/kg causing a blood pressure rise of 80–100 mm Hg. All doses are expressed in weight of free base.

<sup>3</sup> Atropine, 2 mg/kg i.v.

<sup>4</sup> Contraction compared with that of acetylcholine (0.5 mg/l), isolated muscle, RINGER solution, doses in mg/l.

<sup>5</sup> Contraction of isolated intestine strip compared with that of

tetramethylammonium iodide (1 mg/l), Tyrode solution, doses in mg/l.

<sup>6</sup> 1%: Calc., 58.57; found, 58.52.

<sup>7</sup> 1%: Calc., 54.92; found, 55.10.

<sup>8</sup> 1%: Calc., 51.78; found, 51.86. The melting point of the compound is erratic (125–138°) and is lower than the reported value of 145°. However the purity of this sample and the other quaternaries was checked by paper chromatography.



Research on the Proliferation Activity of Erythroblasts from Pernicious Anaemia in Relapse under Low Atmospheric Pressure

In a previous note, published in this same journal<sup>1</sup>, we reported the results of an experimental research, aimed at investigating the development of proliferation activity of the erythroblast from normal bone-marrow (normoblast) living under low atmospheric pressure. Such a research was carried out on bone-marrow cultured *in vitro* and directly submitted to various pressure levels. It proved that, under such a condition, erythropoietic proliferation decreases with the decrease of tension level and that a lineal relation does exist, at least as regards pressure values included between 760 → 160 mm Hg; viz: proliferation activity decreases with an intensity which is a function of the vacuum degree. It also proved that the decrease rates of the basophile and of the polychromatophile erythroblasts are different; the former cell showing more reaction than the latter.

In the present note, we report the results of a similar research on bone-marrow erythroblast from pernicious anemia in relapse (megaloblast), keeping in mind that megaloblast is endowed with some biological peculiarities differing from those of normoblast<sup>2</sup>. For this research, we used the same technical procedures followed in our previous investigation<sup>3</sup>. Particularly, the culture medium was prepared using the plasma from the subjects who had supplied bone-marrow, i.e., in this case, plasma of patients suffering from pernicious anemia in relapse. This plasma was added with an optimum dose of colchicine, in order to investigate the proliferation activity according to the ASTALDI-MAURI stathmocinetic test<sup>4</sup>. Cultures were put into a special apparatus, previously described<sup>3</sup>, where depressions from 760 to 160 mm Hg were obtained and maintained.

Table I (see on page 262) reports the average stathmocinetic indices of the cases studied, obtained under different pressure levels, respectively relating to the basophile and polychromatophile megaloblasts and normoblasts. These indices show the ratio of proliferation obtained under the different conditions, and they are expressed as percentages in respect to the proliferation activity of the basophile at 760 mm Hg; such an activity being conventionally assumed = 100.

In order to establish the significance of the results, they were submitted to the analysis of variation with three criteria, viz: subjects—differentiation phase—degree of pressure. The results are reported in Table II.

Moreover, the stathmocinetic indices reached under the different pressure levels were interpolated, in order to establish the quantitative relation between the lowering of pressure and the decrease in megaloblast proliferation activity. The results reported in the diagram reveal the following functions:

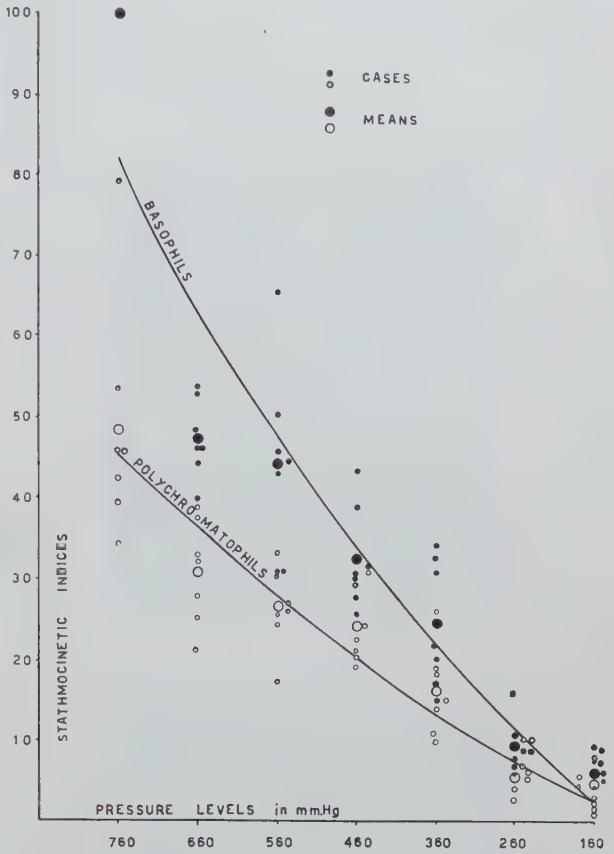
$$f(xi) = 33.9 + 0.134(xi-M) + 0.0001 (xi-M)^2;$$

for the basophile, and

$$f(xi) = 20.7 + 0.134(xi-M) + 0.0001 (xi-M)^2;$$

for the polychromatophile.

Finally, the indices of megaloblast proliferation activity were compared with those of the normoblast by statistical method (using STUDENT-FISHER *t*<sup>2</sup> and SNEDECOR's *F*). The results are reported in Table III.



The stathmocinetic index in basophils at 760 mm Hg is considered equal to 100.

The results of our investigations show that:

- (1) The decrease of pressure levels causes a decrease in the proliferation activity of megaloblasts.
- (2) The more intense the decrease in pressure level, the lower the proliferation activity.
- (3) Such a phenomenon occurs both in basophile and polychromatophile megaloblast, but the response of the basophile megaloblast to pressure variations is significantly different from that of the polychromatophile megaloblast. Particularly, in the latter an increased vacuum causes a heavier reduction of proliferation than in the former.
- (4) The response of pernicious anemia erythroblasts (megaloblasts) to pressure variations is significantly different from that of normal bone-marrow erythroblasts (normoblasts). Particularly, in the latter an increased vacuum causes a heavier reduction of proliferation than in the former.

To summarize, we may conclude that hypoxia, when acting directly on bone-marrow surviving *in vitro*, acts as an inhibiting factor on erythroblast proliferation activity—irrespective of whether erythroblast is a normoblast or a megaloblast, but that these two cellular types react in a quantitatively different manner. Thus, it remains to be established whether the different biology of the two cellular types—normoblasts and megaloblasts—, or whether only the greater proliferation activity of megaloblasts<sup>1</sup> is the cause of the greater

<sup>1</sup> G. ASTALDI, E. BERNARDELLI, and G. REBAUDO, *Exper.* **8**, 117 (1952).

<sup>2</sup> P. JONES, *Arch. Path.* **35**, 752 (1943). – G. ASTALDI, C. MAURI, and A. ALLEGRI, *Haematol.* **34**, 1091 (1950).

<sup>3</sup> G. ASTALDI, E. BERNARDELLI, and G. REBAUDO, *Le Sang* **23**, 293 (1952).

<sup>4</sup> G. ASTALDI and C. MAURI, *Haematol.* **33**, 583 (1949); *Le Sang* **21**, 378 (1950).

<sup>1</sup> G. ASTALDI, C. MAURI, and A. ALLEGRI, *Haematol.* **34**, 1091 (1950).

reaction to hypoxia detected in the pernicious bone-marrow. This problem might be solved by experiments on bone-marrow with higher proliferation activity than normal marrow, but containing normoblasts and not megaloblasts, such as the marrow in thalassemia major<sup>1</sup>.

G. ASTALDI, E. BERNARDELLI,  
and G. REBAUDO

Department of Internal Medicine, University of Pavia,  
February 10, 1953.

<sup>1</sup> G. ASTALDI and P. TOLENTINO, J. Clin. Pathol. 5, 140 (1952).

### Resumé

Les auteurs ont étudié l'action de l'hypoxie sur la prolifération des mégalo-blastes dans l'anémie pernici- cieuse et ont mis en évidence un effet inhibiteur. Le phénomène est analogue à celui qui a été démontré pour l'érythroblaste de la moelle osseuse normale, mais il en diffère en ce sens que la sensibilité négative du mégalo- blaste est plus grande que celle du normoblaste. Il n'est pas encore établi s'il s'agit d'une action spécifique en rapport avec la biologie différente des deux cellules ou simple- ment liée à leur différent degré d'activité prolifératrice, plus élevé pour le mégalo-blaste que pour le normoblaste.

Table I  
Averages of Stathmocinetic Indices Under Different Pressure Levels

Pressure Levels mm Hg	Proliferation							
	Mean	$m \pm \sigma_m$	Dispersion	$\sigma \pm \sigma_\sigma$	Mean	$m \pm \sigma_m$	Dispersion	$\sigma \pm \sigma_\sigma$
	Basophile normoblasts				Polychromatophile normoblasts			
760	100	$\pm 0$	0	$\pm 0$	64.6	$\pm 2.51$	7.94	$\pm 1.77$
660	88.4	$\pm 3.13$	9.90	$\pm 2.21$	53.3	$\pm 2.25$	7.13	$\pm 1.59$
560	83.3	$\pm 2.68$	8.47	$\pm 1.89$	44.3	$\pm 2.36$	7.48	$\pm 1.67$
460	52.8	$\pm 4.22$	13.34	$\pm 2.98$	28.1	$\pm 2.76$	8.75	$\pm 1.95$
360	43.9	$\pm 2.28$	7.21	$\pm 1.61$	24.2	$\pm 1.77$	5.61	$\pm 1.25$
260	35.1	$\pm 1.29$	4.08	$\pm 0.91$	18.7	$\pm 1.39$	4.42	$\pm 0.98$
160	27.2	$\pm 1.86$	5.88	$\pm 1.31$	14.0	$\pm 1.21$	3.83	$\pm 0.85$
	Basophile megaloblasts				Polychromatophile megaloblasts			
760	100	$\pm 0$	0	$\pm 0$	48.8	$\pm 5.26$	13.9	$\pm 3.71$
660	47.6	$\pm 1.74$	4.6	$\pm 1.22$	30.9	$\pm 2.15$	5.7	$\pm 1.52$
560	44.6	$\pm 4.20$	11.1	$\pm 2.97$	26.7	$\pm 1.78$	4.7	$\pm 1.25$
460	32.9	$\pm 2.15$	5.7	$\pm 1.52$	24.2	$\pm 1.55$	4.1	$\pm 1.09$
360	24.8	$\pm 3.33$	8.8	$\pm 2.35$	16	$\pm 1.89$	5	$\pm 1.34$
260	9.3	$\pm 1.21$	3.2	$\pm 0.85$	5.9	$\pm 0.90$	2.4	$\pm 0.64$
160	6.2	$\pm 0.64$	1.7	$\pm 0.45$	5	$\pm 0.95$	2.5	$\pm 0.66$

Table II  
Results of Variation Analysis with Three Different Criteria

Sources	Degrees of freedom	Sum of the squares	Mean square	F ratio (SNEDECOR)	F significative	
					5%	1%
Totale . . . . .	98	64 220.3				
Between pressures . . . . .	6	39 822.5	6 637.1	26.1	2.36	3.35
Between differentiation phases . . . . .	1	5 999.9	5 999.9	23.6	4.11	7.39
Between cases . . . . .	6	521.5	86.9	0.3	2.36	3.35
Interaction pressures-phases . . . . .	6	5 894	982.3	3.9	2.36	3.35
Interaction phases-cases . . . . .	6	337	56.2	0.2	2.36	3.35
Interaction pressures-cases . . . . .	36	2 239.4	62.2	0.2	1.73	2.18
Residue (experimental error, etc.) . . . . .	37	8 406	254.2			

Table III  
Significance of the Differences Between Averages

Between basophile and polychromatophile megaloblasts				Between megaloblasts and normoblasts							
				Basophile				Polychromatophile			
$t^2$	$F$		Judgment	$t^2$	$F$		Judgment	$t^2$	$F$		Judgment
	0.1	0.5			0.01	0.05			0.01	0.05	
7.1	6.91	3.94	+	12.9	6.82	3.92	+	14.4	6.82	3.92	+



Etude de l'action du shock sur la concentration en acides nucléiques des différentes fractions cytoplasmiques du foie

Nous avons pu montrer que le shock traumatique est suivi d'une exagération de l'activité phosphatasique du foie<sup>1</sup>. Nous basant sur les travaux de DE DUVE et de ses collaborateurs<sup>2</sup>, nous avons pu préciser que c'est la glucose-6-phosphatase qui augmente. L'étude comparative de l'activité des diverses fractions cytoplasmiques nous a révélé que cette hyperactivité se situe surtout au niveau des microsomes. De plus, l'activité enzymatique des gros microsomes entraînés avec les mitochondries diminue, en même temps que le liquide surnageant acquiert une activité phosphatasique qu'il ne possède pas avant le shock<sup>3</sup>.

Par ailleurs, on sait depuis les travaux de BRACHET et JEENER<sup>4</sup>, et DE KABAT<sup>5</sup> que les phosphatases cytoplasmiques sont incluses pour une grande part dans les granules à acides nucléiques; or, des études histochemiques et des dosages<sup>1</sup> ont prouvé que le shock traumatique entraîne une chute importante de la concentration en acide ribonucléique au niveau du foie. Il nous a paru dès lors indiqué d'étudier le comportement des acides nucléiques dans les différentes fractions cytoplasmiques au cours du shock.

Nous avons pratiqué deux genres de shock chez 10 rats mâles provenant du même élevage: l'écrasement des parties molles des membres postérieurs (5 cas) et l'hémorragie par section des vaisseaux carotide et jugulaire d'un côté (5 cas); 6 rats ont servi de témoins. Le foie a été prélevé 2 h plus tard et les fractions ont été préparées comme dans notre travail antérieur<sup>3</sup>. L'étude histochemique de l'acide ribonucléique des foies de rats shockés par hémorragie a été faite sur des coupes de 10  $\mu$  fixées au formac et colorées au mélange UNNA.

Les dosages des acides nucléiques ont été pratiqués selon la méthode de SCHNEIDER<sup>6</sup> en employant la technique à l'orcine modifiée par MILLER et collaborateurs<sup>7</sup> pour l'acide ribonucléique et celle de DISCHE pour l'acide désoxyribonucléique; le dosage de l'azote a été effectué selon la technique de KJELDAHL modifiée par MARKHAM<sup>8</sup>.

<sup>1</sup> F. MOYSON, Acta chir. belg. 51, 262 (1952); Arch. Biol. (avril 1953).

<sup>2</sup> C. DE DUVE, J. BERTHET, H. G. HERS et L. DUPRET, Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 1242 (1949). – H. G. HERS, J. BERTHET, L. BERTHET et C. DE DUVE, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 21 (1951).

<sup>3</sup> F. MOYSON et F. GAVOSTO, Bioch. biophys. Acta 10, 479 (1953).

<sup>4</sup> J. BRACHET et R. JEENER, Acta biol. belg. 1, 476 (1941).

<sup>5</sup> E. H. KABAT, Science 1, 43 (1941).

<sup>6</sup> W. L. SCHNEIDER, J. biol. Chem. 161, 293 (1945).

<sup>7</sup> G. L. MILLER, E. E. MILLER et R. H. GOLDER, Fed. Proc. 9, 206 (1950).

<sup>8</sup> R. MARKHAM, Bioch. J. 36, 790 (1942).

1° L'étude histochemique des foies après hémorragie conduit à des conclusions identiques à celles que l'un de nous avait tirées de l'examen des foies après shock traumatique<sup>1</sup>: oedème cellulaire et intercellulaire, augmentation du nombre des cellules de KUPFFER dont un plus grand nombre est devenu basophile, infiltration cellulaire surtout au niveau des espaces portes, disparition des flammèches basophiles (blocs de BERG) avec coloration uniforme du cytoplasme (Fig. 1 et 2).

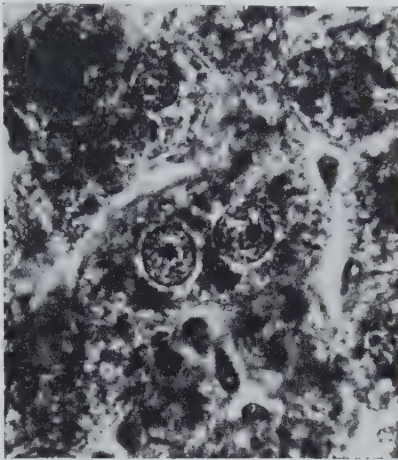


Fig. 1. Foie normal.

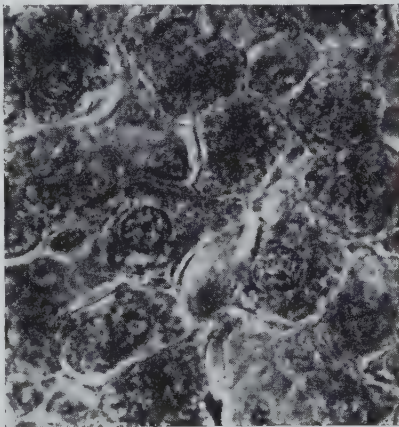


Fig. 2. Foie après hémorragie.

2° Les valeurs moyennes de nos dosages sont consignées dans les tableaux suivants:

<sup>1</sup> F. Moyson, Acta chir. belg. 51, 262 (1952).

Tableau I  
A.R.N. (valeur exprimée en milligrammes par gramme de tissu frais)

	Homogénat total		Mitochondries		Microsomes		Surnageant	
	Valeur moyenne $\pm 2 \sigma_m$	Milligrammes A.R.N. par 100 mg N total	Valeur moyenne $\pm 2 \sigma_m$	% quantité totale	Valeur moyenne $\pm 2 \sigma_m$	% quantité totale	Valeur moyenne $\pm 2 \sigma_m$	% quantité totale
Témoin . .	8,400 $\pm$ 1,170	37,2 $\pm$ 3,35	1,690 $\pm$ 0,450	20	2,620 $\pm$ 0,580	33,5	1,010 $\pm$ 0,340	12,2
Shock . .	6,340 $\pm$ 1,060	32,8 $\pm$ 4,10	0,950 $\pm$ 0,200	15,2	2,400 $\pm$ 0,980	35	1,340 $\pm$ 0,170	21,4
Hémorragie	9,400 $\pm$ 0,890	39,1 $\pm$ 3,70	1,320 $\pm$ 0,340	16,4	3,520 $\pm$ 0,580	38,2	2,160 $\pm$ 0,350	23,2

Tableau II

	A.D.N. dans homogénat total		Rapport A.R.N./A.D.N.
	Milligrammes par gramme de tissu frais (va- leur moyenne) $\pm 2\sigma_m$	Milligrammes par 100 mg N total (valeur moyenne) $\pm 2\sigma_m$	
Temoin . . .	2,025 $\pm$ 0,110	9,9 $\pm$ 0,5	4
Shock . . .	2,150 $\pm$ 0,190	11,5 $\pm$ 1,2	2,95
Hémorragie	2,890 $\pm$ 0,360	12 $\pm$ 1,4	3,25

Confirmant nos résultats antérieurs, nous voyons que le shock traumatique entraîne une diminution de l'A.R.N. de l'homogénat total. L'hémorragie ne semble pas avoir le même effet: la déperdition aiguë de toutes les protéines plasmatiques a pour effet de mobiliser toutes les protéines disponibles et d'en activer la synthèse. Si nous considérons les différentes fractions, nous voyons qu'il y a, dans les deux sortes de shock, une grande quantité d'A.R.N. dans le liquide surnageant: ce résultat concorde avec ceux de DROCHMANS<sup>1</sup>, dans le cas de l'anoxie hépatique aiguë obtenue par la ligature de la veine porte.

On sait que CHANTRENNE<sup>2</sup> a établi l'hétérogénéité des divers granules hépatiques; les plus gros sont les plus riches en ferments, mais ils sont pauvres en A.R.N. Il est vraisemblable que ce sont les plus grosses parmi les mitochondries qui se détruisent sous l'action de l'hypoxie qu'entraîne le shock. Enfin, on notera que la concentration des A.D.N. par rapport à l'azote total de l'homogénat total reste presque inchangée; la diminution évidente du rapport A.R.N./A.D.N. chez les rats ayant subi un shock traumatique et chez ceux qui ont subi une saignée confirme entièrement les observations cytochimiques: elle correspond à la chute de la basophilie cytoplasmique, sans variation comparable de la colorabilité des noyaux et elle concorde parfaitement avec les données récentes de l'école de DAVIDSON<sup>3</sup>.

F. GAVOSTO et F. MOYSON

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles, le 5 février 1953.

### Summary

A traumatic shock decreases the ribonucleic acid content of the liver in the rat, as shown by both cytochemical and quantitative methods. In homogenates of the livers from the operated animals, the ribonucleic acid content increases in the supernatant after ultracentrifugation while it decreases in the mitochondrial fraction. The desoxyribonucleic acid is not affected by the traumatic shock.

<sup>1</sup> P. DROCHMANS, Arch. Biol. 61, 475 (1947).

<sup>2</sup> H. CHANTRENNE, Bioch. biophys. Acta 1, 437 (1947).

<sup>3</sup> R. Y. THOMSON, F. G. HEAGY, W. C. HUTCHINSON et J. N. DAVIDSON, Bioch. J. 53, 460 (1953).

## Influence des stimuli thermoalgésiques sur la réactivité à la douleur de la souris

Conditions d'application d'une variante de la méthode algésimétrique de WOOLFE et MACDONALD

Dans un travail récent de ce laboratoire, l'un de nous, en collaboration avec SZERB<sup>1</sup>, a signalé que la toute

<sup>1</sup> J. JACOB et J. SZERB, Arch. int. Pharmacodyn. 90, 301 (1952).

première exposition de souris à un stimulus thermoalgésique fournissait un temps de réaction moyen inférieur à celui de la seconde détermination.

On pouvait donc penser qu'un stimulus thermoalgésique est lui-même capable de modifier la réactivité à la douleur et nous nous sommes proposé de préciser quelques-unes des variations systématiques qui surviennent dans les temps de réactions de souris exposées à ces stimuli à des intervalles variables. Outre son intérêt propre, cette étude semblait devoir permettre d'attirer l'attention sur les conditions d'applications de la méthode algésimétrique de WOOLFE et MACDONALD<sup>1</sup> dont plusieurs variantes ont été récemment décrites par différents auteurs<sup>2</sup>.

La variante utilisée dans ce laboratoire<sup>3</sup> est surtout caractérisée par: a) des modifications dans l'appareillage; b) la constance de la température de la plaque chauffante (58°C), les temps de réaction (T.R.) servant à estimer la sensibilité des animaux; c) la réaction choisie comme test qui est, en raison de sa netteté, le réflexe de léchement.

Il a tout d'abord été observé que la deuxième détermination fournissait toujours un T.R. moyen supérieur à celui de la toute première, et cela pour des intervalles de 3, 15, 30 et 120 min entre les deux expositions. Le Tableau I illustre ce phénomène; pour des groupes de 25 animaux, on y voit que la différence est significative pour les intervalles de 3, 30 et 120 min et ne l'est pas pour l'intervalle de 15 min; dans ce dernier cas cependant, le recours à des lots plus importants, comme, par exemple, celui des 100 souris du Tableau II, permet d'assurer la signification statistique de la différence observée. – Un écart moyen de 4,9 s fut également observé entre première et deuxième détermination chez 15 souris surrénalectomisées exposées à 3 min d'intervalle. Il semble donc que la toute première exposition entraîne une diminution, à la fois de la réactivité à la douleur, précoce et durable, et que ce phénomène n'est pas d'origine cortico- ou médullo-surrénalienne.

Les expositions suivantes ont des effets beaucoup plus variables dont nous ne pouvons, jusqu'à présent, étudier que le résultat global. Celui-ci varie selon la fréquence et le nombre des expositions. Si la fréquence est faible (une exposition toutes les 2 h) on n'observe plus guère de variations des T.R. (Fig. 1A). – Pour les fréquences élevées – nous avons, à cet effet, réalisé des groupes de trois expositions à 3 min d'intervalle, toutes les 30, puis toutes les 120 min – les T.R. présentent d'importantes fluctuations qui, individuellement, sont mal systématisées mais qui aboutissent à une intense élévation (Fig. 1, CII). Le même phénomène s'observe, peut être intensifié, chez des souris surrénalectomisées (Fig. 1, CI). Lorsque les T.R. sont ainsi augmentés, un repos de 14 h ne suffit pas pour les faire revenir à la normale. Il convient d'observer que cet allongement des T.R. ne traduit pas nécessairement, de façon exclusive, une analgésie, au sens propre du mot, car les souris présentent alors un état de prostration plus ou moins accusé.

Les fréquences moyennes furent surtout explorées sous la forme de témoins servant à d'autres expériences; la courbe B de la Figure illustre l'un des cas le mieux étudié dans lequel un repos de 3 h sépare 4 mesures

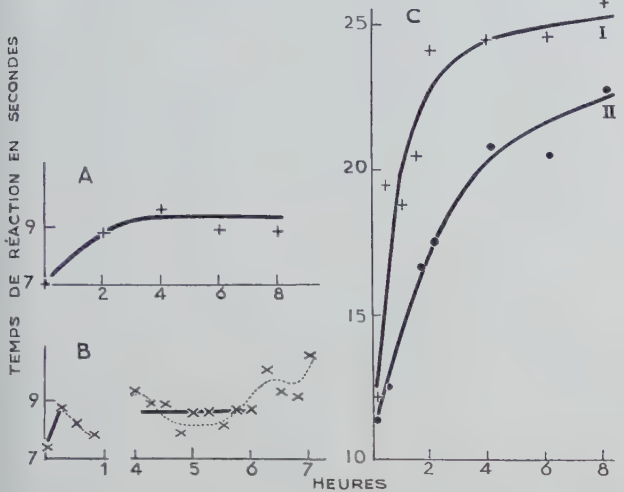
<sup>1</sup> G. WOOLFE et A. D. MACDONALD, J. Pharmacol. 80, 300 (1944).

<sup>2</sup> N. B. EDDY, C. TOUCHBERRY et J. E. LIEBERMANN, J. Pharmacol. 98, 121 (1950). – A. LESPAGNOL, F. MERCIER, J. BERTRAND et J. MERCIER, Ann. Pharmacol. françaises 8, 241 (1950). – J. PORSZASZ et F. HERR, Acta Physiol Acad. Sci. Hung. 2, 469 et 479 (1951). – J. Y. B. CHEN et H. BECKMAN, Science 113, 631 (1951).

<sup>3</sup> J. JACOB et J. SZERB, Arch. int. Pharmacodyn. 90, 301 (1952). – J. SZERB et J. JACOB, Exper. 7, 466 (1951).



préliminaires d'un groupe de 14 autres, réalisées à 15 min d'intervalle; on y voit que, pour ce groupe de 14 mesures, les valeurs obtenues ont une constance satisfaisante pendant 2 h mais qu'elles tendent ensuite à s'accroître.



Influence de la fréquence des expositions sur les temps de réaction. A = Fréquence faible: 25 souris. B = Fréquence moyenne: 76 souris. En tirets, les fluctuations non significatives. C = Fréquences élevées: chaque point correspond à la moyenne de 3 déterminations réalisées à 3 min d'intervalle. I: 15 souris surrénalectomisées. II: 20 souris normales.

On remarquera aussi que la première détermination qui suit le repos de 3 h a fournis un T.R. moyen supérieur à ceux des expositions préliminaires. En outre, la période de stabilité montre en réalité, au début, une tendance à la diminution des T.R. qui n'est pas significative mais nous paraît cependant mériter d'être signalée, car cette tendance est également manifeste dans un graphique de EDDY et coll.<sup>1</sup>.

Tableau I  
Comparaisons entre les résultats fournis par deux déterminations successives chez des souris neuves (groupes de 25 animaux)

Intervalle (en minutes)	1 <sup>re</sup> détermination		2 <sup>e</sup> détermination		Différence	Indice <i>t</i>
	T.R. moyen (s ±)	E.S. de la moyenne	T.R. moyen (s ±)	E.S. de la moyenne		
120	7,14	0,34	8,84	0,45	+ 1,7	3,0
30	6,77	0,43	8,12	0,46	+ 1,35	2,14
15	7,56	0,48	8,36	0,63	+ 0,8	1,0
3	8,24	0,56	12,6	1,12	+ 4,36	3,35

De ces observations, deux espèces de conclusions nous semblent pouvoir être déduites. 1° Les premières sont théoriques: l'exposition d'un animal à un stimulus thermoalgésique modéré est capable de modifier sa réactivité à la douleur; le tout premier stimulus a toujours diminué cette réactivité et il n'est pas exclu que ce phénomène soit en relation avec les analgésies succédant à des traumatismes ou émotions intenses (KIESSIG et ORZECZOWSKY<sup>2</sup>) ou à une douleur localisée (PARSONS et GOETZL<sup>3</sup>). Dans notre cas, il n'est pas d'origine sur-

rénalienne. Les stimuli répétés ont des effets variables selon la fréquence des expositions; une stabilisation n'est réalisée que pour des fréquences modérées, et cela de façon d'autant plus durable que cette fréquence est plus faible. Nous sommes enclins à voir, dans cette stabilisation, une espèce de processus adaptatif dont les limites sont dépassées pour les hautes fréquences d'exposition.

Tableau II  
Résultats de 4 déterminations successives à 15 min d'intervalle (groupe de 100 souris triées au cours des deux premières expositions et réparties en 20 lots de 5 animaux)

Déterminations	T.R. moyen (secondes)	DS <sub>1</sub>	DS <sub>2</sub>	E.S. de la moyenne
1	6,5	2,1	1	0,21
2	7,6	2,4	1	0,24
3	7,8	3,4	1,6	0,34
4	8,1	4,3	1,9	0,43

T.R. = Temps de réaction. E.S. = Erreur standard. DS<sub>1</sub> = Déviation standard individuelle =  $(\sum d^2x)/n-1$  où  $dx$  = déviation de chaque valeur individuelle à partir de la moyenne et  $n = 100$ . DS<sub>2</sub> = Déviation standard par groupe de 5 souris =  $(\sum d^2y)/n'-1$  où  $dy$  = déviation de la moyenne obtenue avec chaque lot de 5 animaux à partir de la moyenne générale et  $n' = 20$ .

2° D'un point de vue pratique, l'application de cette méthode à l'étude de substances analgésiques nous semble devoir respecter les conditions suivantes:

- a) la valeur des T.R. fournie par la toute première détermination ne peut être utilisée comme valeur témoin;
- b) la fréquence des déterminations doit être modérée et adaptée à la durée de l'expérience projetée; pour des expériences de durée moyenne, des intervalles de 15 à 30 min permettent une stabilisation satisfaisante.

D'une façon générale, il convient en outre de trier les souris, et cela grâce aux résultats des premières mesures en éliminant celles qui présentent alors un T.R. égal ou supérieur à 14 s. Le Tableau II montre les résultats obtenus dans ces conditions pour quatre mesures réalisées à 15 min d'intervalle, avec triage au cours des deux premières déterminations.

Ces valeurs nous ont servi de base pour des expériences rapides de simple détection d'une activité analgésique: en effet, si un groupe de 5 souris triées a fourni, à la seconde détermination, un T.R. moyen de  $7,6 \pm 1$ , la probabilité pour que le T.R. soit spontanément égal ou supérieur à 14 s, lors des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> mesures, est inférieure à 0,01: en d'autres termes, si l'administration d'une substance à un tel groupe entre les deuxième et troisième mesures provoque une ascension des T.R. moyens de 6 s, on peut conclure à l'activité du produit étudié.

L'intervalle qui sépare la 3<sup>e</sup> de la 2<sup>e</sup> mesure, utilisé pour traiter les animaux, peut être sans inconvénient porté de 15 à 60 min selon le temps nécessaire pour la manipulation des groupes étudiés.

Dans l'ensemble, et avec des petits groupes d'animaux, cette variante de la méthode de WOOLFE et MACDONALD a permis de mettre en évidence les actions de 5 mg/kg s.-c. de morphine, 2 mg/kg s.-c. d'amidone, 100 mg/kg i.-p. de pyramidon et de salicylamide; les salicylates et l'acide acétylsalicylique, par contre, n'ont eu d'effet, par diverses voies, qu'à des doses directement subtoxiques.

J. JACOB et Mme G. GRASSI-GIALDRONI

Laboratoire de Pharmacologie, Service de Chimie Thérapeutique Institut Pasteur, Paris, le 12 février 1953.

<sup>1</sup> N. B. EDDY, C. TOUCHBERRY et J. E. LIEBERMANN, J. Pharmacol. 98, 121 (1950).

<sup>2</sup> H. J. KIESSIG et G. ORZECZOWSKY, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 197, 391 (1940-1941).

<sup>3</sup> C. M. PARSONS et F. R. GOETZL; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 327 (1945).

### Summary

Certain features of a modification of WOOLFE and MACDONALD algometric method are outlined.

Systematic variations of the mean reaction times occur independently of every manipulation other than the exposition of mice to thermoalgesic stimuli. The principal ones are:

(1) The second determination yields a mean value which is always superior to that of the first one.

(2) Repeated determinations yield values which become stable only when the frequency of the expositions is relatively low (one every 15 min or less); with high frequency exposures (group of three exposures every 30 or 120 min) the mean reaction time increases considerably.

These variations still appear after adrenalectomy. Practical conditions for the use of this method concerning the study of analgesics are deduced from these facts and an experimental scheme is given as an illustration.

### A Humoral Agent with Immediate Eosinopenic Effect other than Cortisone

Fluctuations in the number of circulating eosinophils have recently been the subject of numerous papers in connection with the different states of "stress-conditions". The literature supports the statement that activation of the non-specific defence mechanism is regularly followed about 4 h later by a pronounced diminution of circulating eosinophils. In the so-called Thorn-test<sup>1</sup>, a decrease of eosinophils of more than 50% indicates a sufficient reserve of the hypophyseo-adrenal axis. Authors generally assume that cortisone-like substances liberated from the adrenals during different injuries (adrenaline, formaline, salicylate, etc.) are responsible for the eosinopenic effect. This statement was based on the well known fact that only cortisone and hydrocortisone are capable of producing significant eosinopenia in adrenalectomised animals. Cortisone therefore was regarded as the end-substance of the above mechanism.

Some controversial data, however, were published in the past. According to ROMANI<sup>2</sup>, the mechanism of eosinopenia induced by cortisone and A.C.T.H. differs from that of formaline and adrenaline. OLÁH and VARRÓ<sup>3</sup> demonstrated that the cortisone eosinopenia fails to develop in deep hexobarbitone narcosis.

It is a well-known fact that 3–4 h are necessary for the development of a significant fall of eosinophils, whatever kind of stressors were used—even if the suspected end-substance, cortisone, was administered. It is interesting in this relation that LOVE<sup>4</sup> succeeded in producing eosinopenic response in animals subjected to adrenalectomy as soon as 10 min after stress. It seems therefore that sufficient amounts of cortisone are liberated during this short period, and the subsequent time is needed for developing the eosinopenic effect of cortisone. The conception of a direct effect of cortisone is finally weakened by the fact that up to the present no one has been able to demonstrate irrefutably its *in-vitro* eosinolytic power.

We therefore supposed that cortisone induces eosinopenia by mobilizing some hitherto unidentified substance.

**Experiments.**—Experiments were carried out on albino rats weighing 100–180 g. Eosinophil counts were taken by the modified Dunger-Method<sup>1</sup>. Rats were stressed by 50  $\mu$ g subcutaneous adrenaline. At the time of eosinophil depression blood was withdrawn from the (decapitated) donors. Serum was isolated within 30 min and 0.5–0.75 ml was injected in the tail vein of acceptor rats. Eosinophils were counted immediately before and 10, 20, 30 min after the serum was injected.

Control animals received sera of non-stressed rats under similar experimental conditions.

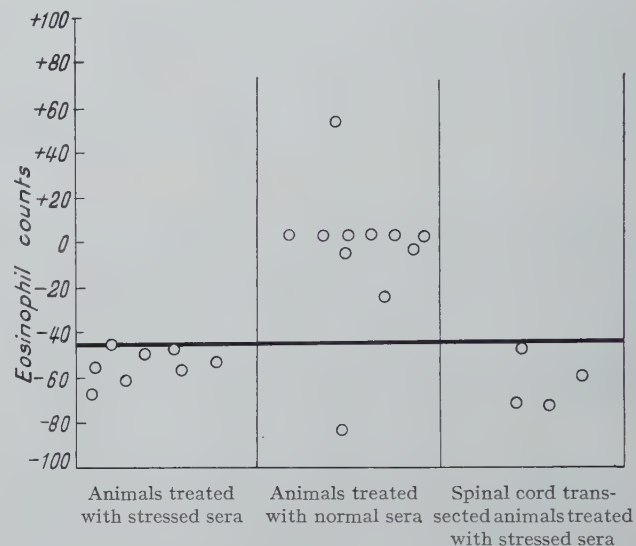


Fig. 1.—Percent changes of the circulating eosinophils of rats in the first 30 min after different serum-transfusions.

Results are presented in Figure 1. As demonstrated, sera of stressed animals regularly induced significant eosinopenia within 10–30 min. This phenomenon failed to develop in rats transfused with non-stressed sera.

Absolute eosinophil count of rats after intravenous administration of Cortone-Merck.

No.	Microgram dose	Eosinophil counts				
		Control	After the Cortisone injection			
			10 min	20 min	30 min	4 h
1	125	1280	3500		2740	216
2	125	885	2350	1370	1090	
3	62.5	760	1105	510	516	55
4	62.5	1010	1175	1010	922	
5	50	378	415	333	333	

In further experiments we administered 62.5–125  $\mu$ g cortisone (Cortone-Merck was diluted with physiological saline 1:400–1:200, and 1 ml was injected intravenously). Eosinophils were counted before and 10, 20, 30 min after the injection. To control the preparation in two cases the 4 h eosinophil count was also determined.

As is shown in the Table intravenous cortisone fails to produce a significant eosinopenia within 30 min. On the contrary a moderate eosinophilia is the rule.

<sup>1</sup> A. DUNGER, Münch. med. Wschr. 57, 1942 (1910). – I. RECENT *et al.*, J. Clin. Endocrin. 10, 187 (1950).

<sup>1</sup> G. W. THORN *et al.* J. Amer. Med. Assoc. 137, 1005, 1544 (1948).

<sup>2</sup> J. P. ROMANI, C. r. Soc. Biol. 146, 654 (1952).

<sup>3</sup> F. OLÁH, V. VARRÓ, M. MAJOROS, K. KOVÁCS, and D. BACH-RACH, Orvosi Hetilap 92, 1129 (1951).

<sup>4</sup> W. D. LOVE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 639 (1950).



We investigated further the role of autonomic nervous pathways in the production of the transmissible immediate eosinopenia. The thoracic part of the spinal cord (between  $D_1$ – $D_2$ ) of acceptor rats was transected. On the second day transfusions were carried out using stressed and normal sera under conditions described above.

As is shown in Figure 1, the transection of the spinal cord does not alter the transmissible eosinopenia.

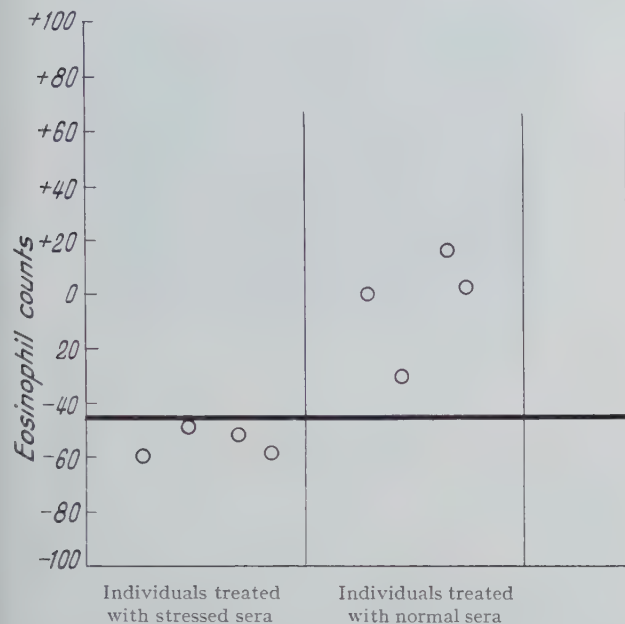


Fig. 2.—Percent changes of the circulating eosinophils of humans in the first 30 min after different serum-transfusions.

Finally we performed similar experiments in humans. The donor was treated with 400  $\mu$ g adrenaline s.c. and after the development of a significant eosinopenia (the Thorn-test was performed in every case) 300–350 ml blood was withdrawn under sterile conditions. Blood clotting was prevented by physiological citrate solution (1:10) and plasma was isolated by centrifuging. We then injected 100–140 ml of (isolated) plasma into acceptor-patients, free from any demonstrable hypophyseo-adrenal lesion. The eosinophil counts of acceptors were determined as in the animal experiments. Control experiments were carried out on the same persons with the plasma of non-stressed subjects.

Figure 2 shows that, as in our rat-experiments, a significant eosinopenia develops within 10–30 min in persons receiving stressed plasma, while no change occurs in the controls.

**Discussion.**—We demonstrated that sera deriving from individuals stressed with adrenaline 4 h before possess the capacity to produce significant eosinopenia within 30 min if transfused to normal subjects.

This phenomenon suggests the circulation of a substance during eosinopenia, being capable of evoking an immediate “eosinopenic” action, in contrary to cortisone.

Although it is very unlikely that cortisone has any direct effect on eosinophils, this possibility cannot be ruled out by our present experiments.

B. TANOS, S. SZILASY, V. VARRÓ,  
A. EISNER, and F. OLÁH

I. Department of Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary, March 3, 1953.

### Zusammenfassung

Es wird gezeigt, dass Serum aus adrenalinvorbehandelten Ratten, vier Stunden nach Adrenalininjektion in normale Tiere transfundiert, bereits nach 30 min eine mehr als 50 %ige Eosinopenie verursacht. Das Auftreten eines humoralen Wirkstoffes während der Eosinopenie wird diskutiert und mit Cortison verglichen.

### Sensibilité du spermophile (*Citellus fluvus concolor*) à *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*-B. C. G.

Nous avons découvert la sensibilité du hamster (*Mesocricetus auratus*) au bacille B.C.G.<sup>1</sup>, et continuant nos essais, nous avons confirmé que les passages en série de l'infection étaient possibles chez le hamster soit par inoculation d'organes de hamsters morts, soit par inoculation de cultures provenant de ces organes. Au cours des passages chez *Mesocricetus auratus*, les inoculations systématiques d'organes ou de cultures provenant de ces organes à des cobayes, ont confirmé, dans la limite de nos expériences, l'absence de pouvoir pathogène du bacille B.C.G. pour cet animal. Enfin, nous avons constaté que des doses de bacilles B.C.G. très inférieures à celles utilisées dans nos premières expériences (1 mg par exemple) étaient capables de tuer le hamster après inoculation intra-péritonéale.

Nous nous sommes demandés si d'autres rongeurs possédaient une sensibilité semblable à celle du hamster. Nous avons constaté que le spermophile (*Citellus fluvus concolor*) était, lui aussi, sensible au bacille B.C.G.<sup>2</sup>.

Trois spermophiles ont été inoculés par voie intra-péritonéale avec 150 mg de bacilles B.C.G., trois par la même voie avec 100 mg et trois avec 50 mg. Huit de ces animaux sont morts dans des délais variant entre deux et quatre mois, sans qu'il paraisse y avoir de rapport entre la dose inoculée et le temps de survie. Un est encore vivant. A l'autopsie on constate une hypertrophie de la rate sans tubercules visibles, les autres organes paraissant normaux à l'examen macroscopique. Le foie, la rate, les reins, les poumons contiennent des quantités considérables de bacilles acido-alcoolo-résistants. Le spermophile est bien entendu sensible au bacille tuberculeux humain ou bovin par voie sous-cutanée à des doses de 0,1 mg. La mort survient alors en un à deux mois. A l'autopsie on constate souvent des tubercules visibles macroscopiquement sur la rate, le foie, le poumon. On peut trouver des ganglions grossis et caséifiés. Les organes contiennent des quantités assez grandes de bacilles acido-alcoolo-résistants, moins importantes peut-être que celles observées chez les animaux inoculés avec le bacille B.C.G.

Cette sensibilité du spermophile n'a pour nous aucun rapport avec la valeur immunisante du bacille B.C.G. contre la tuberculose de l'homme. Elle n'est que la traduction d'une sensibilité particulière d'une espèce animale.

P. HAUDUROY et W. ROSSET

Institut d'hygiène, Université de Lausanne, le 26 mars 1953.

<sup>1</sup> P. HAUDUROY et W. ROSSET, C. r. Acad. Sci. 232, 445 (1951).

<sup>2</sup> Ces rongeurs nous ont été procurés par M. le docteur BALTAZARD, Directeur de l'Institut Pasteur de Téhéran, que nous tenons à remercier très vivement de son obligeance.

### Summary

The authors discovered the sensitivity of the gold hamster to tubercle bacillus B.C.G. in 1951. Continuing their experiments with different rodents which are not usually employed in the laboratory, they have shown that *Spermophilus citellus* is also sensitive not only to the human and bovine type of tubercle bacillus but also to B.C.G. bacillus.

### Der Einfluss von Myleran auf die Keimdrüsen von Ratten

Myleran ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$ ) wurde kürzlich von HADDOW und TIMMIS<sup>1</sup> als Zytostatikum beschrieben. Dank seinem besonders stark hemmenden Effekt auf die Granulopoese erwies sich Myleran bei chronisch-myeloischen Leukämien als ein wirksames Medikament (GALTON<sup>2</sup>, BOLLAG<sup>3</sup>). Wir möchten hier auf eine Nebenwirkung von Myleran aufmerksam machen. Unsere erste mit Myleran behandelte 42jährige Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie wurde nach 8wöchiger Medikation amenorrhöisch und blieb es seither (1½ Jahre Beobachtungszeit). Wir haben deshalb Tierversuche vorgenommen, um die Frage der Schädigung der Keimdrüsen durch Myleran abzuklären.

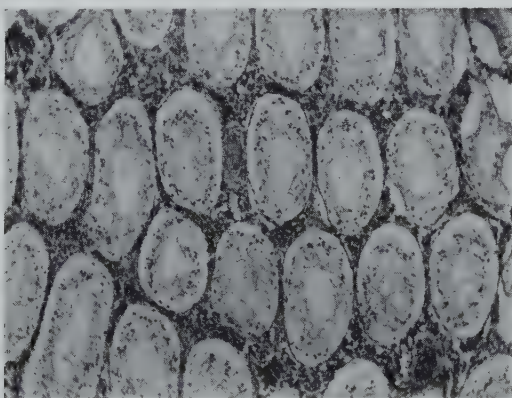


Abb. 1. Testis von Ratte, 2 × 2 mg Myleran injiziert. Nach 150 Tagen Keimepithel völlig zerstört. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 90:1.

**A. Wirkung von Myleran auf die männlichen Keimdrüsen.** 6 männliche weisse Ratten von 180 g Gewicht erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion von 2 mg in Arachidöl gelöstem Myleran. Die Tiere wurden nach 2 bzw. 4 Wochen getötet. Die histologische Untersuchung des Testes ergab noch eine normale Spermiogenese. Weiteren 10, 180 g schweren männlichen Ratten injizierten wir im Abstand von 2 Wochen je 2 mg Myleran intraperitoneal. Je 2 Tiere wurden nach 30, 60, 90, 120 bzw. 150 Tagen getötet und histologisch untersucht. 30 Tage nach der ersten Injektion war bereits eine Verringerung der Anzahl der Zellschichten in den Tubuli contorti zu verzeichnen. Nach 60 Tagen waren keine Spermatozoen mehr vorhanden. An die Membrana propria schlossen sich nur noch 2–3 Schichten von Spermatogonien und Spermatozyten an. Im Zentrum fanden sich vereinzelte multinukleäre Riesenzellen. Nach 90 Tagen war das Keimdrüsengewebe

auf eine einzige Schicht von Zellen mit pyknotischen Kernen reduziert. 120 und 150 Tage nach der ersten Injektion von Myleran waren die Testes auf die Hälfte ihrer üblichen Grösse zusammengeschrumpft. Das Keimepithel war völlig zerstört. Die Tubuli contorti waren von einem Schwammgerüst mit einzelnen Bindegewebszellen ausgefüllt. Das interstitielle Gewebe zeigte eine mässige Zellvermehrung (Abb. 1).

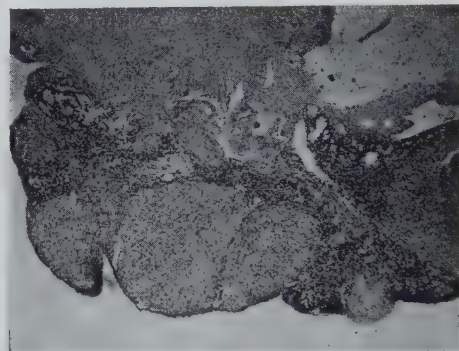


Abb. 2. Ovar von Ratte, 3 × 2 mg Myleran injiziert. Nach 100 Tagen keine Follikel mehr. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 40:1.

**B. Wirkung von Myleran auf die weiblichen Keimdrüsen.** Je 5 weibliche, 180 g schwere weisse Ratten erhielten 1 bzw. im Abstand von 2 Wochen 2 intraperitoneale Injektionen von 2 mg Myleran. Weder nach 2 noch nach 4 Wochen konnten in den Ovarien histologische Veränderungen festgestellt werden. 9 weitere gleich schwere weibliche Tiere wurden innert 4 Wochen 3mal mit je 2 mg Myleran injiziert. Je 3 Ratten wurden 60, 80 bzw. 100 Tage nach der ersten Injektion getötet und histologisch untersucht. In den Ovarien konnte man nach 60 Tagen noch einzelne Oozyten bzw. Follikel sehen. Nach 80 bzw. 100 Tagen waren jedoch keine Follikel mehr vorhanden. Corpora lutea waren noch erhalten (Abb. 2).

Myleran schädigt, wie das schon von anderen Mitosegiften, wie Nitrogen Mustard und Triäthylenmelamin, bekannt ist, ausser der Hämatopoese auch die sich in intensiver Proliferation befindenden Keimdrüsen.

W. BOLLAG

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 9. März 1953.

### Summary

Male and female albino rats were treated with Myleran ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$ ). Particular attention was paid to the histological examinations of the gonads of these animals. The testes as well as the ovaries were badly damaged. The male germinal epithelium was completely destroyed. Oocytes and follicles were no longer present in the ovaries.

### Tests Used in the Localization of Cerebral Function in Trained Monkeys

**Introduction.**—A decisive advance in the study of cerebral localisation was made in the important pioneer work done by FRITSCH and HITZIG<sup>1</sup> (Fig. 1) and by

<sup>1</sup> A. HADDOW und G. M. TIMMIS, Lancet I, 207 (1953).

<sup>2</sup> D. A. G. GALTON, Lancet I, 208 (1953).

<sup>3</sup> W. BOLLAG (1953, im Druck).

<sup>1</sup> G. FRITSCH und E. HITZIG, Arch. Anat. Physiol. wiss. Med. 37, 300 (1870).



FERRIER<sup>1</sup>. Until that time it had been assumed that the cerebral cortex could not be electrically stimulated and that its functions were purely mental. Even eminent men working on brain research, such as FLOURENS<sup>2</sup>, had regarded the hemispheres as the seat of the will and of the emotions, not directly concerned in originating muscle movements. After cerebral ablations FLOURENS found that the animals had no urge to move and were apparently asleep, but when he threw a bird in the air it was still able to fly. He reached his conclusions mainly in the course of experiments on the dove brain, which was natural enough, since the organisation of the bird brain differs vastly from that of mammals.

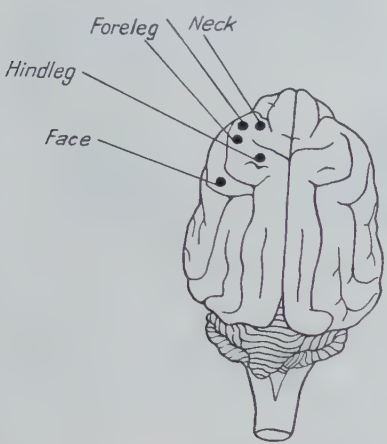


Fig. 1.—Illustration of the first cortical motor foci found after electrical stimulation. (Tracing of an original drawing in the paper by FRITSCH and HITZIG, 1870.)

The classical studies of FRITSCH, HITZIG, and FERRIER marked the beginning of modern brain research, and terms such as “brain centres” were introduced by the first two workers. There are still differing opinions about whether motor and sensory functions are focal, that is whether they can be accurately localized, or whether they overlap to any extent. There can be no doubt that since the time of FRITSCH, HITZIG, and FERRIER the use of the term “motor cortex” has proved justified. However, we do not yet know whether this motor cortex, by some mosaic-like arrangement, initiates individual muscle contractions or whole movement patterns, leaving the detailed execution of the movements to lower levels such as the spinal cord.

We found in our monkey experiments (GLEES and COLE<sup>3</sup>) that there is little probability of a very rigid localisation within the motor cortex, for our study of the recovery of motor function showed that motor power and skill were regained even after relatively severe damage to the motor cortex.

Our more recent work on the sensory cortex has also shown that there is very considerable interrelation between the motor and sensory cortices. The sensory cortex, lying immediately posterior to the motor cortex, transmits to it the sensory signals required for any specific movement. We also observed that damage to the sensory cortex will produce motor defects and that

damage to the motor cortex will reduce the coordination of the musculature. The close interrelation between these two major convolutions was apparent from the results of our new tests for motor and sensory function, which we feel would interest a wider circle of readers through the pages of this journal.

*Observations.*—Although it is comparatively easy to recognize evidence of sensory impairment in man, in animals this is possible only after a long period of careful training before operation. A human being can describe his symptoms to the doctor, whereas an animal's defects are not evident except through tests.



Fig. 2.—Monkey (*M. nemestrina*) doing the match box drawer test. Index finger and thumb are mostly used for this test. Note the weights fastened to the drawer.

With our match box drawer test (GLEES and COLE<sup>1</sup>) it is possible to make a quantitative assessment of motor power in the hand (Fig. 2). We found that motor lesions cause a certain clumsiness in the movement of the fingers which still remains after full recovery of motor power. To measure the extent of this clumsiness we constructed a simple apparatus (the dexterity board) and tests with this produced clear and constant results. However, only the simplest tests will give good results, for the more complicated ones confuse the monkey, and overstraining sometimes gives rise to frustration and other neurotic signs which many last for a considerable time.

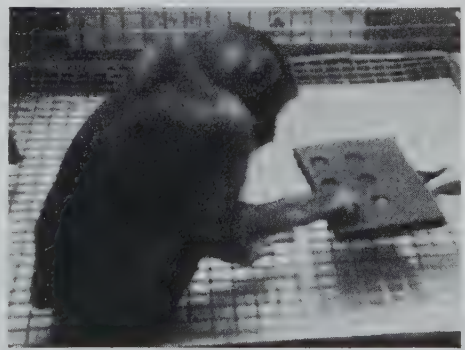


Fig. 3.—Monkey (*M. nemestrina*) being tested for dexterity.

The apparatus for measuring dexterity consists of a board with a handle. On one side are six round hollows and on the other twelve (Fig. 3). In each hollow is placed an equally large piece of apple or carrot which the monkey has to pick up with thumb and fingers; the test is made either with the side containing six hollows or

<sup>1</sup> D. FERRIER, *The Functions of the Brain* (Smith Elder, London, 1876).

<sup>2</sup> P. FLOURENS, *Recherches expérimentales sur les Propriétés et les Fonctions du Système nerveux dans les Animaux vertébrés* (Crevot, Paris, 1842).

<sup>3</sup> P. GLEES and J. COLE, *J. Neurophysiol.* 13, 137 (1950); *Die Umschau* 3, 83 (1952).

<sup>1</sup> P. GLEES and J. COLE, *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 188, 440 (1952).

with that containing twelve. The time the monkey takes to pick up either six or twelve pieces of apple or carrot is recorded.

A complete test consists of ten runs, two given each day for five consecutive days. The times recorded are then added up and divided by 10 to give an average. Tests with the dexterity board have proved to be not only a very accurate method of measuring handedness and skill (both before and after brain operations), they also show up individual differences in normal monkeys of the same age and of the same or different species. Our Table shows the results obtained from four intact and one operated monkey. We found that the average time taken by the intact monkeys in 10 complete tests varied by 0.7 seconds; the operated monkey was tested 7 months after a brain operation and 5 months after motor power had reached pre-operative level.

Table  
The average time in seconds taken in 10 complete tests

Animal	6 baits	12 baits
Monkey 1 . . . .	4.3	9.5
Baboon 1 . . . .	4.6	10.1
Monkey 2 . . . .	4.8	10.6
Baboon 2 . . . .	5.0	12.3
Operated monkey	9.1	19.0

Our tests gave evidence of a decrease in dexterity and skill in the use of the fingers and the thumb and showed that the result of lesions in the motor cortex is not confined to motor power but also influences handedness and the coordination of the fingers<sup>1</sup>.

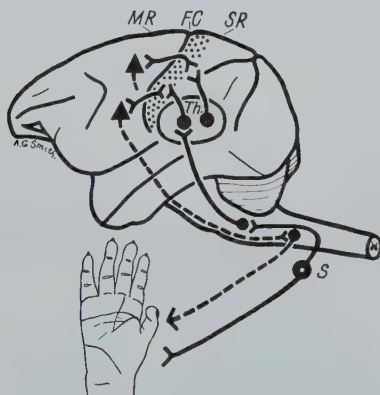


Fig. 4.—Diagrammatic representation of the connections between the receptive sense organs in the hand and the sensory cortex. Fibres from the sensory cortex pass to the motor cortex and from there the descending pyramidal tract, after relaying, leads to the anterior horn cells which innervate the muscles of the arm and hand. Th = thalamus; S = spinal ganglion; SR = sensory cortex; MR = motor cortex; FC = central fissure.

Recently we have extended the scope of our work to include the neighbouring sensory cortex (COLE and GLEES<sup>2</sup>). The diagram shown in Figure 4 illustrates how sensory stimuli of the hand reach the sensory cortex via the spinal ganglion cells after relaying through the

medulla into the thalamus. From there the sensory stimuli reach the sensory cortex (dotted in the diagram). The connections between the sensory and the motor cortex are the means by which the motor cortex receives information from superficial (cutaneous) and deeply situated receptors, whereupon it sends motor signals along descending fibre tracts to direct the musculature of the arm and hand.

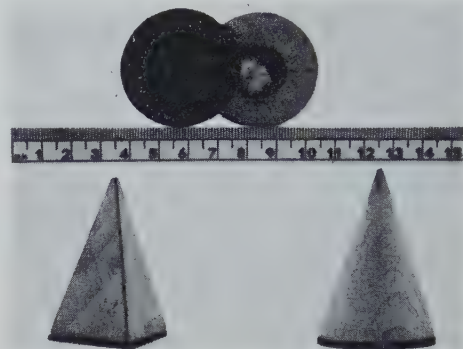


Fig. 5.—The pyramid and cone used in the test for stereognosis.

The dexterity board proved very useful in this work, although a new test had to be evolved in which visual attention played no part. We had found in previous tests that certain defects were masked by visual attention, that is that the use of the eyes can compensate for loss of sensory coordination.

In the new test the monkey had to pick out an object from a leather bag. The objects were a pyramid and a cone, each having a hollow in the base covered by a metallid, and a wedge. The bait was enclosed in the hollow (Fig. 5). The animal was first trained to discriminate between the objects visually, then two of them, usually the pyramid and the cone, were placed in the leather bag, one only being baited. The monkey extended his arm into the bag and had to discriminate between the two objects by touch (Fig. 6). This we termed the test for stereognosis or discrimination of 3-dimensional objects by touch.

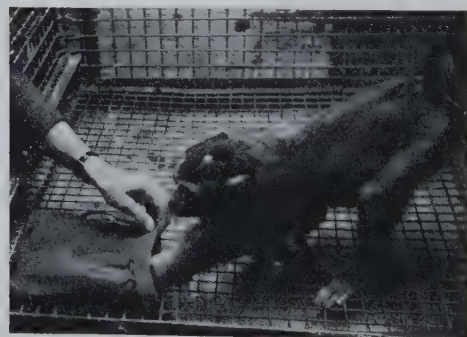


Fig. 6.—Monkey (*M. nemestrina*) discriminating by touch between the pyramid and cone in the leather bag.

After lesions in the sensory cortex monkeys lose the ability to discriminate between the cone and the pyramid, but recovery of this function usually begins after 14 days have elapsed.

So far we have found that only one particular type of Macaque (*Macaca nemestrina*) can be trained to do this test and even young animals below 3.5 kg in weight are not suitable subjects, while those who are over 7 kg

<sup>1</sup> See an article in *Handedness in Monkeys* by COLE and GLEES, Exper. 7, 224 (1951).

<sup>2</sup> J. COLE and P. GLEES, J. Physiol. 115, 15 P (1951).



are much more difficult to train. However, the other tests, such as the match box drawer test, were learned without any difficulty by *Macaca nemestrina*, *Macaca mulatta*, as well as by *Erythrocebus patas* and, of the baboons, by *Papio papio* and *Papio strepitus*.

These tests have been fully described by COLE<sup>1</sup>. They have also been filmed by Professor LIDDELL and our thanks are due to him for this permanent record of the testing process.

**Discussion.**—This work has some connection with clinical neurology and the information gathered by PENFIELD and RASMUSSEN<sup>2</sup> in their important book *The Cerebral Cortex of Man* was of great interest to us. Having electrically stimulated the motor and sensory cortices of unanaesthetised man, these authors came to the conclusion that the motor cortex and the sensory cortex partly overlap and that the functions of the two cortices are not as independent as has been maintained in the classical brain physiology.

The interrelation between sensory and motor cortex was already recognized by FLECHSIG in his myelogenetic studies, but the fact attracted little attention at the time. Now, the existence of this interaction is more widely accepted and the term "sensorimotor cortex" introduced by DUSSE DE BARENNE and McCULLOCH<sup>3</sup>, is used to cover the functions of both cortices. Our experiments have given definite evidence of the intimate connection which must exist between motor and sensory function. We have found that lesions in the sensory cortex produce not only loss of sensory abilities but also motor defects as revealed by our tests.

J. COLE and P. GLEES

*University Laboratory of Physiology, Oxford, February 28, 1953.*

### Zusammenfassung

In Testversuchen an Affen wird durch quantitative Feststellung der motorischen Kraft, durch den Geschicklichkeitstest und den Test für Stereognosis (für sensorische Funktion) gezeigt, dass weitgehendste Funktionswiederherstellung nach Läsionen in der motorischen oder sensorischen Rinde möglich ist. Daher lässt sich die Vorstellung einer Mosaikstruktur der motorischen oder sensorischen Rinde für die Funktionswiederherstellung nach Hirnläsion nicht anwenden. Intakte Unterabteilungen der motorischen oder sensorischen Rinde können die zuerst auftretenden Funktionsausfälle kompensieren. Weiterhin zeigen diese Versuche, dass die funktionelle und anatomische Verbindung zwischen motorischer und sensorischer Rinde sehr stark ist. Ohne Zweifel kommen der motorischen Rinde gewisse sensorische Funktionen zu (Geschicklichkeitstest). Sensorische Rindenläsionen ergeben eine zeitweilige Herabsetzung der motorischen Kraft. Die Auffassungen von DUSSE DE BARENNE, McCULLOCH (1936), PENFIELD und RASMUSSEN (1950), die von einer sensorimotorischen Rinde sprechen, werden durch die Versuche an trainierten Affen gestützt.

<sup>1</sup> J. COLE, J. comp. Physiol. Psychol. 45, 226 (1952).

<sup>2</sup> W. PENFIELD and T. RASMUSSEN, *The Cerebral Cortex of Man* (Macmillan Co., New York, 1950).

<sup>3</sup> J. G. DUSSE DE BARENNE and W. S. McCULLOCH, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 35, 329 (1936).

## PRO LABORATORIO

### Die quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs

Nachdem von BODE, HÜBENER, BRÜCKNER und HOERES<sup>1</sup> gezeigt wurde, dass bei der Überführung von ninhydringefärbten Aminosäuren in einen Metallfarbstoff dieser zur quantitativen Bestimmung besser geeignet ist als die Ninhydrinreaktion allein und dass bei dieser Methode die meisten Aminosäuren sowie das Tripeptid Glutathion die gleiche molare Extinktion besitzen, lag es nahe, das Verfahren auch zur Bestimmung des Amino-N zu benutzen.

Zu diesem Zweck wurden Aminosäuren in molarer Lösung bei pH 6,5 mit einer 1%-Ninhydrinlösung in 50% Äthanol gekocht und dann die blaue Ninhydrinfarbe mit Kupfernitrat in den roten Metallfarbstoff verwandelt. Die Kupferlösung wurde von KAWERAU und WIELAND<sup>2</sup> zur Konservierung von ninhydringefärbten Chromatogrammen angegeben. Die einzelnen Aminosäuren haben so meist gleiche molare Extinktion, ein Befund, den wir ja bereits bei der papierchromatographischen Untersuchung erhoben hatten<sup>1</sup>.

Wenn wir Urin in der gleichen Weise behandelten, um den Aminostickstoff zu bestimmen, zeigte es sich jedoch, dass die Werte der einzelnen Urinproben sehr grosse Schwankungen aufweisen. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, dass im Harn Substanzen vorhanden sind, die die Reaktion stören. Einer dieser Stoffe ist der Harnstoff. Bringt man nämlich Harnstoff in die molaren Aminosäurelösungen, so ergeben sich ungleichmässige Werte.

Es wäre nun möglich, durch geeignete Massnahmen den Harnstoff aus dem Urin zu entfernen, jedoch würde durch diese Manipulationen das Verfahren kompliziert. Es lag daher nahe, die papierchromatographische Trennung der Harnsubstanzen zu benutzen, um die störende Wirkung des Harnstoffs und eventuell anderer Substanzen auszuschalten. Diese Überlegung führte zum Ziel.

Bei Personen, die ähnlichen Ernährungsbedingungen unterworfen sind und keinerlei diuretisch wirksame Stoffe, wie zum Beispiel Koffein, zu sich nehmen, bewegt sich der Aminostickstoffgehalt des Harnes in engen Grenzen, wenn man den Urin nach dem Frühstück untersucht. Dazu verfahren wir folgendermassen:

Auf Chromatographiepapier (etwa Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) tragen wir 30 mm<sup>3</sup> Harn auf und entwickeln das Chromatogramm in einem Gemisch von Butanol, Wasser und Eisessig. Nach gründlichem Trocknen besprühen wir von beiden Seiten mit einer 0,5prozentigen Lösung von Ninhydrin in mit Wasser gesättigtem Butanol und lassen die Ninhydrinreaktion bei 80–100°C im Thermostaten während 20 min zustande kommen. Danach besprühen wir das Chromatogramm mit der Kupfernitratlösung (1 cm<sup>3</sup> einer gesättigten Kupfernitratlösung wird mit 0,2 cm<sup>3</sup> 10prozentiger Salpetersäure versetzt und mit 95prozentigem Äthanol auf 100 aufgefüllt). Dann wird bei Zimmertemperatur getrocknet. Die unterschiedlichen Farbtöne der Ninhydrinfärbung sind dabei in ein gleichmässiges Rot umgeschlagen.

Nun zerschneidet man einfach den ganzen Chromatographiestreifen und schüttelt den Farbstoff mit Methanol aus. Das Eluat wird gegen dasjenige eines Leer-

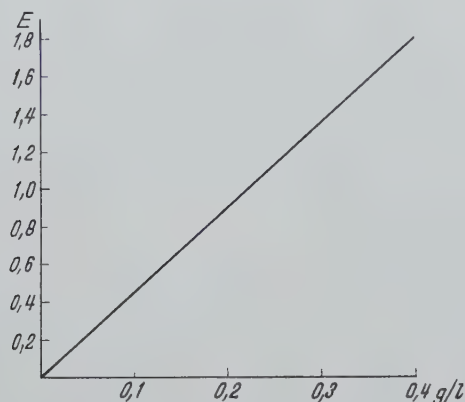
<sup>1</sup> F. BODE, H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER und K. HOERES, Naturwissenschaften 39, 524 (1952).

<sup>2</sup> E. KAWERAU und TH. WIELAND, Nature 168, 4263 (1951).

streifens photometrisch gemessen (siehe Abb.). Die Eichkurve wurde mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 510 m $\mu$ .

#### Die Bestimmung von Peptiden.

Bei der beschriebenen Methode erfassen wir im wesentlichen freie  $\alpha$ -Amino-Karboxylgruppen (eine Ausnahme bildet zum Beispiel Aminoäthylalkohol). Wenn wir noch Aussagen über gebundenen Aminostickstoff machen wollen, kommt ein Hydrolysat des Harnes zur Untersuchung. Dazu muss der Harn enteiweißt werden. Wir benutzen die sehr empfindliche Methode nach SEVAG-LACKMAN und SMOLENS<sup>1</sup>.



Eichkurve zur Bestimmung des Amino-N im Harn.  
Amino-N aus 30 mm<sup>3</sup> Harn in 4 cm<sup>3</sup> Methanol.

30 mm<sup>3</sup> des enteiweißten Harnes geben wir in einen steilwandigen Porzellantiegel (Wärzchen) und fügen 32prozentige Salzsäure dazu und hydrolysieren während 6 h bei 80–90°C. Der Rückstand wird in Äthanol gelöst und dieses wieder verdampft, um die Salzsäure möglichst

<sup>1</sup> M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).

vollkommen zu entfernen; dann wird, wie bereits beschrieben, verfahren. Der Wert nach Hydrolyse ist höher als vor Hydrolyse, da ja zusätzliche ninhydrinpositive Gruppen frei wurden. Wir bezeichnen jeweils die Differenz zwischen den beiden Werten, die für die relative Höhe des Peptidgehaltes charakteristisch ist. Es muss betont werden, dass der Wert nach Hydrolyse kein Absolutwert ist, da mit der beschriebenen Methode Aminosgruppen nicht quantitativ frei werden. Jedoch ist der Wert als Vergleichswert zwischen verschiedenen untersuchten Flüssigkeiten zu gebrauchen.

Die Anwendung der Methode zur Bestimmung der freien und gebundenen Aminosäuren im Harn zeigte zum Beispiel folgendes<sup>1</sup>: Beim Normalen beträgt der durchschnittliche Aminostickstoffwert 0,2 g/l. Der durchschnittliche Differenzwert 0,03 g Amino-N/l. Beim grippalen Infekt ist der Wert vor Hydrolyse nur gering erhöht (0,21 g/l), jedoch der Differenzwert 0,09 g/l, ein Zeichen für eine verstärkte Peptidausscheidung. Bei der Leberzirrhose ist der Amino-N-Gehalt sehr hoch (0,4 g/l) der Differenzwert beträgt jedoch nur 0,018 g/l Amino-N. Hierbei sind offensichtlich die freien Aminosäuren erhöht, die Peptide jedoch vermindert.

Die Methode ist anwendbar zur Untersuchung weiterer biologischer Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Organextrakten, Serum, Liquor oder Pflanzenextrakten.

F. BODE

Aus dem Laboratorium des Verfassers, Georg-Speyer-Strasse 14, Frankfurt am Main, den 9. April 1953.

#### Summary

In the previous publication the quantitative determination of amino N was described. In the present work the reaction of the  $\alpha$ -amino-carboxyl group with ninhydrine and copper nitrate is used. The resulting red colour can be measured with the spectrophotometer by 510 m $\mu$ . For the elimination of disturbing substances paperstrip chromatography is used.

<sup>1</sup> F. BODE, H. E. BRUCH und G. BECKER, mündliche Mitteilung.

## Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

### Plant Biochemistry

By JAMES BONNER

537 pages and 133 figures  
(Academic Press Inc., New York, 1950)  
(\$6.20)

Der Verfasser versucht, über den Rahmen von Fortschritts-, Vortrags- und Tagesberichten hinaus, eine Zusammenschau der Ergebnisse auf den verschiedenen Arbeitsgebieten der Biochemie höherer Pflanzen zu geben. Sein Buch, welches sich in erster Linie an Hochschullehrer und Studenten wendet, stellt damit ein Novum dar, das insbesondere in Europa, wo die moderne

amerikanische Literatur häufig noch schwer zugänglich ist, begrüßt werden wird. Diesem Interesse kommt die jedem Kapitel angefügte Literaturliste sehr entgegen, die sich in Übersichtsberichte und Spezialarbeiten gliedert. Selbstverständlich kann man bei der heutigen raschen Entwicklung der Biochemie kaum erwarten, dass alle abgehandelten Gebiete die gleiche Kritik und Abgerundetheit aufweisen wie der Abschnitt über die Pflanzenproteine, dem eigenen Arbeitsgebiet des Verfassers. So hätte der Referent zum Beispiel gern etwas über Blastokoline und Welkstoffe sowie über den Keimfähigkeitsnachweis mit Tetrazoliumsalzen gelesen. Das Thema «Auxine» sollte in einer späteren Auflage kritischer behandelt, der Abschnitt über Pflanzensäuren etwa zugunsten demjenigen der Alkaloide verkürzt



werden usw. Das ändert aber nichts daran, dass mit Fleiss, Sorgfalt und didaktischem Geschick ein auch für den Wissenschaftler anregendes Werk geschaffen worden ist, dessen Ausstattung in Druck und Bild als vorbildlich gelten kann. – In der Einleitung wird eine Propädeutik der Biochemie der Zelle, der Enzymwirkungen und des Pflanzenstoffwechsels gegeben. Teil I enthält in 5 Kapiteln die Chemie und physikalische Chemie der Kohlenhydrate sowie deren Auf- und Abbauvorgänge in den Pflanzen. Teil II gibt in 7 Abschnitten ein Bild von den Bestandteilen, dem Aufbau und den Funktionen der Zellmembranen. Teil III handelt von den Pflanzensäuren und den pflanzlichen Atmungssystemen. In Teil IV sind in 8 Kapiteln eingehend die Stickstoffkomponenten und deren Stoffwechsel (auch bei Keimlingen) sowie die Stickstoffbindung und -entbindung zusammengestellt. Teil V befasst sich mit den sekundären Pflanzenstoffen: Fette und Fettstoffwechsel, ätherische Öle, Karotinoide, Kautschuk, Anthozyanine und Anthoxanthine. Im letzten, dem VI. Teil werden Fragen des Pflanzenwachstums und der Wuchsstoffe sowie die moderne Entwicklung der Photosynthese besprochen. Ein Autoren- und ein gutes Inhaltsverzeichnis schliessen das Werk ab.

H. J. BIELIG

Electron Microscopic Histology of the Heart

*An application of the Electron-microscopic; Research to Physiology*

By B. KISCH and J. M. BARDET

106 pages with many figures  
(Brooklyn Medical Press, New York, 1951)  
(\$ 5.-)

Die Verfasser konnten mit Hilfe ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Herzen der Maus zwei Arten von Myofibrillen nachweisen. Die A- oder bambusähnlichen Fibrillen, welche segmentiert sind, und runde Gebilde, die B-Fibrillen, welche glatt erscheinen und in einem netzartigen Verband stehen. Diese Methode erlaubt es auch, das Sarkolemma zu untersuchen sowie die Gefässe genau zu beobachten und bildmässig festzuhalten.

Im zweiten, physiologischen Teil wird versucht, die mit Hilfe des Elektronenmikroskops nachgewiesenen Gefässe, welche, wie die Verfasser angeben, das Sarkolemma durchstossen und somit zwischen den kontraktilel Elementen und dem Zellkern verlaufen, in ihrer besonderen physiologischen Bedeutung zu beurteilen.

Sehr interessant ist auch die Feststellung, dass das Z-Bandsystem möglicherweise wie die Sarkosomen besonders mit Enzymen angereichert zu sein scheint und somit aktiv in die chemischen Umsetzungen der Muskelfasern eingreift.

Die Elektronenmikroskopie gibt also, wie aus den Befunden zu entnehmen ist, die Möglichkeit, den submikroskopischen Bau der einzelnen Elemente genau zu untersuchen. Zu warnen ist jedoch vor Artefakten, welche durch die doch sehr robuste Technik gesetzt werden. Weitere Beobachtungen werden jetzt den Beweis für die

sehr interessanten und wichtigen Befunde erbringen müssen. Das 106 Seiten starke Buch ist reich illustriert und bringt sehr viele neue Aspekte.

W. BEJDL

Experimentelle Histo-Pathologie

*Ein Einführungskurs*

Von H. MEESSEN

153 Seiten und 125 Abbildungen  
(Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1952)  
(kart. DM 22.50)

Der Verfasser versucht im vorliegenden Buch, experimentell erzeugte histo-pathologische Befunde, welche nach einer sehr sinngemäss aufgebauten Einteilung vor Augen geführt werden, in Form eines Kurses zusammenzustellen. In den Vordergrund wird das Bild gestellt, aus welchem einerseits der Befund abgelesen wurde, andererseits aber auch noch Raum genug gelassen wird, um eigene Ideen einzubauen und vor allem aber auch Anregungen zu entnehmen. Die Befunde sind knapp und leicht verständlich, die Bilder meist gut und eindrucksvoll, wenn auch manchmal die Angabe der Vergrösserung wünschenswert wäre.

Das Buch bietet somit dem wissenschaftlich Interessierten nicht nur eine Fülle von experimentell gewonnenen Präparaten, sondern wirkt sicherlich auch anregend, an der Erforschung dieses speziellen Wissensgebietes mitzuarbeiten, und ist auf das beste zu empfehlen.

W. BEJDL

Anatomia comparata dei vertebrati

*I<sup>a</sup> parte: Classificazione dei vertebrati; Apparecchio tegumentario*

Da NELLO BECCARI

265 pagine con 131 figure  
(Sansoni, Edizioni scientifiche, Firenze 1951)

Das vorliegende Buch ist der erste Teil einer vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. Der Autor, der bei der Darstellung des Stoffes und der Auswahl der Abbildungen die langjährige Erfahrung verwertet, die er als vergleichender Anatom in Florenz gesammelt hat, hat es unternommen, «eine fühlbare Lücke im italienischen Schrifttum» auszufüllen; doch darf dieses Werk über jenen Sprachbereich hinaus das Interesse aller vergleichenden Anatomen und Histologen in Anspruch nehmen. In einem ersten Teil wird die Systematik der Chordaten, im besonderen der Wirbeltiere, kurz abgehandelt. Darauf folgt eine ausführliche Beschreibung des Integumentum commune und seiner Anhangsorgane bei den verschiedenen Klassen. Erfreulicherweise wird die mikroskopische Anatomie sehr ausführlich behandelt, wobei auch die vergleichende Entwicklung des Hautorgans berücksichtigt wird. Die Ausstattung und der Druck sind vorzüglich.

K. S. LUDWIG

# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

## STUDIORUM PROGRESSUS

### The Colour Change of the Zoea of the Shrimp, *Crangon crangon* L.

By F. PAUSCH, Gdańsk<sup>1</sup>

**Introduction.**—It was in the middle of the nineteenth century that zoologists detected in some decapod crustaceans the existence of integumentary chromatophores, as well as the physiological colour change produced by their activity. But the first detailed description of the chromatic activity in shrimps and prawns was given by POUCHET<sup>2</sup>, whose observations in this field were later developed by KEEBLE and GAMBLE<sup>3</sup> and by MINKIEWICZ<sup>4</sup>. On the basis of the results obtained by these older investigators the conclusion can be drawn that some shrimps and prawns possess the capacity of adapting themselves to the coloration of the background.

A next step, and a very important one in the research work on crustacean colour change, was made by KOLLER<sup>5</sup>, who detected that this process is regulated by hormones present in the circulating blood. PERKINS<sup>6</sup>, using different methods and working independently, confirmed KOLLER's statement. HANSTRÖM<sup>7</sup> was able to identify the sinus gland of the decapod eye-stalk as a source of chromatophorotropic hormones. According to the present state of knowledge, HANSTRÖM's sinus gland is the most important incretory organ of higher crustaceans, but not the only one. BROWN and his collaborators<sup>8</sup> showed in a series of investigations that chromatophorotropic hormones in decapods can be produced also in some parts of the central nervous system, and especially in the tritocerebral commissures.

The colour change of the shrimp, *Crangon crangon* L., was studied in detail by KOLLER<sup>9</sup>. *Crangon* has a sense of colour; the animal distinguishes blue from yellow, orange and red, but not from green. This rather well-developed colour sense gives the shrimp a very fine adaptation to backgrounds as diverse in colour as white, yellow, orange, red and black. This ability of the animal to harmonize its colour with its environment may be of protective value under natural life conditions.

The structure of the chromatophoral system of the adult shrimp, *Crangon*, is one of the most complex known among the crustaceans. The description of KOLLER contained a list of 4 different pigments (sepia-brown, white, yellow and red), but according to the

later observations of BROWN and WULFF<sup>1</sup>, KOLLER's sepia-brown should be differentiated into a brown and a black pigment. These 5 pigments may appear separately in monochromatic cells or form combinations of bi-, tri- and tetrachromatic chromatophores. The particular types of pigmentary cells constitute groups characteristic of definite regions of the shrimp's body. The complexity of this pattern is further increased by the fact that the chromatophores of the respective body regions may show different physiological properties.

It is known that the animal tends to adapt itself to the colour of the bottom by a kind of neurohumoral reflex. This is brought about in the following manner: once the compound eye has been affected by light, the stimulus is conveyed through the central nervous system to the sinus gland or some neurosecretory centre. The response thus created produces in the gland or the neurosecretory cells a number of hormones which may change the state of the chromatophores. This rather simple scheme of reaction does not give a full explanation for all the manifestations of chromatic adaptation in *Crangon*. In fact the investigations in this field are still faced with a number of unsolved problems. But it has been proved that a very important factor in these reactions is the ratio of light reflected from the background to the incident light (albedo).

The chromatophoral system of the zoea (first larval stage) of *Crangon* is not as complex as that of the adult forms. The chromatophores included in it are few in number and show fairly regular distribution. It contains blackish brown monochromatic pigmentary cells, as well as the less numerous bichromatic ones provided with brown and yellow pigment. As it develops further, this system of chromatophores, from being a primary one (KEEBLE and GAMBLE<sup>2</sup>), evolves into a more complex and irregular secondary chromatophoral system typical of the adult shrimp.

**Experimental results and discussion.**—By studying the zoea's chromatophores under different conditions, it was found that their responses differ essentially from those shown by the chromatophores of the adult shrimp. The reflected light is a non-contributory factor, as only the incident rays are instrumental in producing the colour change. This has been proved by a series of experiments in which the zoeas were placed in 3 different kinds of surroundings, which were: (1) a white-walled container, exposed to sun-light, (2) a black-walled container, subject to similar illumination, and (3) a container placed in the dark-room. Each container received a series of 5 zoeas, which remained in the conditions mentioned on August 19<sup>th</sup>, 1951, from 10 a.m. to 11<sup>30</sup> a.m. (insolation intensity 0.49 cal. g/cm<sup>2</sup>, air temperature 20–35°). All the larvae in the illuminated containers (white-walled and black-walled) reacted by pigment dispersion in the chromatophores and those placed in the dark-room by pigment concentration. Both kinds of pigment were involved in these changes. In this type of colour change the albedo does not appear to play any part whatever, and there is also no adaptation to the background. This conclusion does not conform with the earlier view of KOLLER<sup>3</sup>. This

<sup>1</sup> Department of Biology, Medical Academy, Gdańsk, Poland.

<sup>2</sup> G. POUCHET, J. Anat. Physiol. 8, 401 (1872); 9, 290 (1873); 12, 1 und 113 (1876).

<sup>3</sup> F. KEEBLE and F. W. GAMBLE, Proc. Roy. Soc. London [B] 65, 461 (1900); 71, 69 (1903); Philosoph. Transact. Roy. Soc. London [B] 196, 295 (1904); 198, 1 (1905).

<sup>4</sup> R. MINKIEWICZ, Bull. Acad. Sci. Cracovie 1908, 918.

<sup>5</sup> G. KOLLER, Verh. dtsh. Zool. Ges. 30, 128 (1925); Z. vgl. Physiol. 8, 601 (1928).

<sup>6</sup> E. B. PERKINS, J. exp. Zool. 50, 71 (1928).

<sup>7</sup> B. HANSTRÖM, Kungl. Svenska Vetenskap. Handl. 16, 1 (1937).

<sup>8</sup> F. A. BROWN, Jr., Physiol. Zool. 19, 215 (1946). — F. A. BROWN, Jr., and H. E. EDERSTROM, J. exp. Zool. 85, 53 (1940). — F. A. BROWN, Jr., and A. MEGLITSCH, Biol. Bull. 79, 409 (1940). — F. A. BROWN, Jr., and V. J. WULFF, J. Cell. comp. Physiol. 18, 339 (1941).

<sup>9</sup> G. KOLLER, Z. vgl. Physiol. 5, 191 (1927); 12, 632 (1930).

<sup>1</sup> F. A. BROWN, Jr., and V. J. WULFF, J. Cell. comp. Physiol. 18, 339 (1941).

<sup>2</sup> F. KEEBLE and F. W. GAMBLE, Philosoph. Transact. Roy. Soc. London [B] 196, 295 (1904).

<sup>3</sup> G. KOLLER, Z. vgl. Physiol. 5, 191 (1927).



author writes that "... die Larven... in dunkler Umgebung eine weitgehende Expansion der Pigmente zeigten. Nach Verbringung in helle Umgebung erfolgte deutliche Kontraktion." Evidently KOLLER did not see the difference in the chromatic behaviour of the larvae and that of the adults; this is certainly incorrect.

Further experiments revealed that the effects produced in the chromatophores not only depend on the intensity of light but also on its wave-length. This was proved by transferring the larvae into white-walled containers exposed to sun-light which was passed through 3 different glass filters. These were: (1) an ultraviolet-violet filter (wave-length 300–450  $m\mu$ ), (2) a blue one (wave-length 450–500  $m\mu$ ) and a red one (wave-length about 660  $m\mu$ )<sup>1</sup>. Each container received a series of 6 larvae. After the animals had been irradiated for 1 h (August 19<sup>th</sup>, 1951, from 14 p.m. to 15 p.m., insolation intensity 0.36 cal./cm<sup>2</sup>, air temperature 23°), the state of the chromatophores of the three groups was registered with the following results: (1) a very pronounced pigment dispersion was noted under the ultraviolet filter, (2) a lesser degree of dispersion under the blue filter, and (3) a pigment concentration under the red one. The conclusion to be drawn is that, as regards the zoea's chromatophores, the short-waved rays, and particularly the ultraviolet ones, induce pigment dispersion which produces the effect of darkening of the external coloration, whereas long-waved light tends to produce the concentration of pigment and subsequent paling of the animal. It should also be mentioned here that the results given above stand in no relation to the varying values of intensity of the rays passed through the different filters. The intensity of sunlight passed through the three filters was measured by a thermoelectric solarimetre (the GORCZYNSKI type). The red filter showed the highest intensity value, the blue filter an intermediate one, the ultraviolet-violet filter giving the lowest intensity of the 3 tested glasses. The energy of the filtered light diminishes inversely to the decrease of the pigment dispersion (from long to short waves in the first case and from short to long waves in the second case).

It was also found that the immersion of larvae in an aqueous solution of the sinus gland hormones of an adult shrimp had no effect whatever upon the chromatophores. For this type of experiment, a total number of 16 larvae was used. The chemical colour change agents of the adult animal are evidently inactive in the case of the zoea.

The character of changes observed in the experiments mentioned above seems to indicate that the action of light on the chromatophores is, in this case, a direct one. The behaviour of the chromatophores of the zoea of *Crangon* resembles the type of reaction seen in blinded decapods (KLEINHOLZ and WELSH<sup>2</sup>) and blinded isopods (SMITH<sup>3</sup>, SUNESON<sup>4</sup>) in the mature stage. In animals from these crustaceans groups, in which the neuro-humoral colour change mechanism with the compound eye as receptor is experimentally eliminated, the chromatophores react to illumination by pigment dispersion, caused by direct stimulation of these cells by the rays.

<sup>1</sup> The differences of temperature which could possibly arise in the containers as the consequence of the different transmittance of the filters used, were eliminated by a cooling arrangement which maintained the water temperature on a level approximatively equal to that of the air.

<sup>2</sup> L. H. KLEINHOLZ and J. H. WELSH, *Nature*, London 140, 851 (1937).

<sup>3</sup> H. G. SMITH, *Proc. Roy. Soc. London [B]* 125, 250 (1938).

<sup>4</sup> S. SUNESON, *Kungl. Fysogr. Sällsk. Handl.* 53, 1 (1947).

But it has also been proved by many authors (initially by BABÁK<sup>1</sup>) that the early larval forms of vertebrates

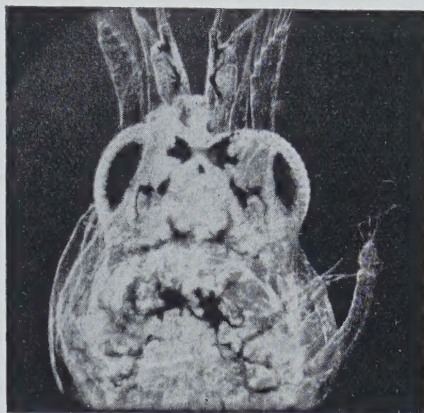


Fig. 1.—The effect of darkness on the chromatophores of the shrimp's zoea: concentration of the pigment.

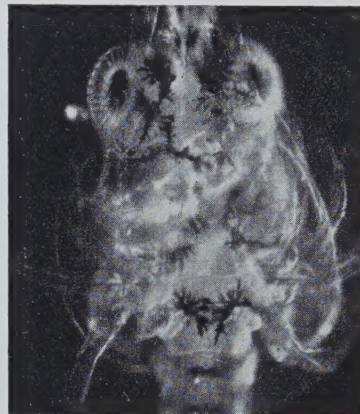


Fig. 2.—The effect of insolation through a blue filter on the chromatophores of the shrimp's zoea: the pigment in the cells less concentrated than that in Figure 1.



Fig. 3.—The effect of insolation without filter on the chromatophores of the shrimp's zoea: dispersion of the pigment.

may show a similar type of chromatophoral reactions. The larvae of many fishes and amphibians react to illumination by melanin dispersion in the chromatophores

<sup>1</sup> E. BABÁK, *Pflügers Arch.* 131, 87 (1910).



and by melanin concentration in same if placed in the darkness. In later stages of development, this primary type of colour response is replaced by a secondary type of response, which consists in the main in a background adaptation. Here the differences can possibly be explained by the respective significance of the chromatophoral system in the life of the larvae and in that of the adults. In the latter, the colour change makes it possible to effect concealment through background adaptation; in the larvae, the activity of chromatophores may lead to protection of internal organs against the harmful effect of light.

This evidently also holds true of the zoea of *Crangon*. In contrast to the adults, the larvae have a planktonic mode of life and float in the superficial water layers, being exposed to an intensive solar irradiation. In this connection it may be interesting to note that their chromatophores are located very closely to the chief internal organs, especially to the nervous system (see the big paired chromatophores between the eyes, Fig. 1 and Fig. 2).

Unfortunately, it was not possible, in my experiments, to observe the metamorphosis of the *Crangon's* zoea into the subsequent larval stages, and for the same reason no observations could be made at which point of development the primary colour response is replaced by the secondary one. It seems rather probable, however, that in settling this question, a comparative consideration of the properties of the chromatophores in other crustacean groups might prove useful.

It is well known that the decapod larvae, the zoea and even more the following mysis stage show a striking resemblance to the adult forms of the *Mysidae*. That also holds true of the chromatophoral system of the shrimp's zoea. It has been proved by KOLLER and MEYER<sup>1</sup> and later by CHICEWICZ<sup>2</sup> that in the *Mysidae* there is a neurohumoral regulation of the chromatophores, comparable to that of the decapods. But CHICEWICZ found also that the pigmentary cells of the mysid species *Praunus flexuosus* can to a certain degree be stimulated directly by light.

Taking for granted that the morphological resemblance of the decapod larvae and the *Mysidae* justifies our making some assumptions as to the existence of common phylogenetic stages in the development of the chromatophoral system, it seems probable that the primary type of response is replaced by the secondary one before the former has developed into the latter. According to this theory, *Praunus* represents the stage in which the response has already developed into the secondary type but the system of chromatophores still persists on the primary level. The same is probably true of the ontogenetic development. This can be presumed from the observations of KEEBLE and GAMBLE<sup>3</sup>, according to

which the decapod larvae show signs of background reaction at the moment at which the eye-stalks grow out.

In this way, the following stages can be assumed to exist in the ontogenetic and phylogenetic development of the chromatophoral system in higher crustaceans and in the types of reactions:

	System	Type of response
1st stage (decapod zoea) . .	primary	primary
2nd stage ( <i>Praunus</i> ) . . . .	primary	secondary
3rd stage (adult decapods) .	secondary	secondary

#### Zusammenfassung

Das Chromatophorensystem der Zoëa-Larve der Sandgarnele *Crangon crangon* L. ist einfacher ausgebildet als das der erwachsenen Garnele und zeigt auch ein anderes Verhalten Lichtreizen gegenüber. Dieses sogenannte primäre Chromatophorensystem reagiert nur auf einfallendes Licht, und zwar durch Pigmentdispersion, wobei kurzwelliges Licht mehr aktiv ist. Das sekundäre Chromatophorensystem der erwachsenen Garnele dagegen zeigt Anpassung an den Untergrund, wobei der jeweilige Zustand der Farbzelle abhängig ist von dem Verhältnis: reflektiertes Licht:einfallendes Licht (Albedo).

Der Farbwechsel des sekundären Systems ist bekanntlich von einem neurohumoralen Reflex mit Einschluss der endokrinen Tätigkeit der Sinusdrüse abhängig, in dem primären System dagegen scheint eine direkte Reizung der Chromatophoren durch Lichtstimuli stattzufinden.

Ein Vergleich mit dem Farbwechsel der *Mysidae* erlaubt zu vermuten, dass auch in der phylogenetischen Entwicklung des Chromatophorensystems der höheren Kruster ähnliche Stadien aufeinanderfolgten.

## CONGRESSUS

### Suisse

#### XI<sup>e</sup> Congrès ornithologique international

Le XI<sup>e</sup> Congrès ornithologique international, présidé par Sir LANDSBOROUGH THOMSON, Londres, aura lieu à Bâle (Suisse) du 29 mai au 5 juin 1954.

Pendant la semaine du Congrès, probablement 5 jours seront réservés aux discussions et 2 jours aux excursions. Avant et après le Congrès (25–28 mai et 7–19 juin) des excursions sont prévues pour faire connaître aux congressistes l'avifaune suisse, avant tout celle des Alpes et Préalpes. L'organisation du Congrès est confiée au Secrétaire général, le professeur A. PORTMANN, Bâle.

Secrétariat du XI<sup>e</sup> Congrès ornithologique international: Jardin Zoologique, Bâle (Suisse).

<sup>1</sup> G. KOLLER and E. MEYER, Biol. Zbl. 50, 759 (1930).

<sup>2</sup> M. CHICEWICZ, Bull. Acad. Sci. Cracovie [B] II (1951), in print.

<sup>3</sup> F. KEEBLE and F. W. GAMBLE, Philosoph. Transact. Roy. Soc. London [B] 196, 295 (1904).



Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acetyl-Digitoxin-Sandoz

Cedilanid

Digilanid

Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A. G.

Monographische Darstellungen können auf Anforderung abgegeben werden.

AUS UNSEREM VERLAGSVERZEICHNIS:

**Die Grundlagen unserer Ernährung und unseres Stoffwechsels**

Von Prof. Dr. E. ABDERHALDEN. Durch Vermittlung gut fundierter Kenntnisse wird zur kritischen Betrachtung von Ernährungsproblemen angeregt. 5. Auflage. 202 Seiten. Fr. 8.85

**Vitamine und Vitamintherapie**

Von Prof. Dr. E. ABDERHALDEN und Prof. Dr. G. MOURIQUAND. Der zuverlässige Berater durch dieses schwierige Gebiet. 408 Seiten. Fr. 29.10

**Spezielle klinisch-chemische Methoden**

Von Prof. Dr. I. ABELIN. Eine Anleitung zur Durchführung neuer und verbesserter Untersuchungsmethoden. In den meisten Fällen werden für jede Bestimmung zwei Methoden angegeben, um einen Vergleich zu ermöglichen und die Untersuchung nach der Ausstattung des Laboratoriums zu richten. 312 Seiten. Fr. 16.90

**Ernährungslehre und Diätetik**

Von Dr. M. J. DEMOLE, Prof. Dr. A. FLEISCH und Dr. CL. PETITPIERRE. Das Buch dient dem Praktiker, der vor der Aufgabe steht, konkrete Anweisungen für eine bestimmte Krankenkost zu geben. 387 Seiten. Fr. 25.80

**Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe**

Von Dr. W. RUDOLPH. Ein Beitrag zum Stoffwechsel der Mikroorganismen. 108 Seiten. Fr. 8.85

**Biochemie des Aminosäurestoffwechsels**

Von Dr. W. RUDOLPH. Eine vorzügliche Orientierung über den gegenwärtigen Stand der biochemischen Forschung. 160 Seiten. Fr. 15.40

**Die Antianeurin-Faktoren**

Von Dr. J. C. SOMOGYI. Mit einem Vorwort von Prof. Dr. A. VON MURALT. Diese bedeutsame Monographie enthält auch eine Zusammenfassung über Wirkstoffe und Gegenwirkstoffe. 120 Seiten. Kart. Fr. 15.60, Ganzleinen Fr. 18.20

**Therapeutische Chemie**

Von Prof. Dr. Th. WAGNER-JAUREGG. Der erste Atlas der Antiseptica, Chemotherapeutica und Antibiotica. 272 Seiten. Kart. Fr. 36.90, Ganzleinen Fr. 39.—

Durch jede Buchhandlung erhältlich

**VERLAG HANS HUBER · BERN UND STUTTGART**